



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

***ANÁLISIS "IN VITRO" DE LA RESPUESTA CITOTÓXICA  
HUMORAL EN EL MODELO DE XENOTRASPLANTE  
CERDO / PRIMATE***

**Tomás M. Díaz Román**  
A Coruña, febrero 2004



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

***ANÁLISIS “IN VITRO” DE LA RESPUESTA CITOTÓXICA  
HUMORAL EN EL MODELO DE XENOTRASPLANTE  
CERDO / PRIMATE***

**Tomás M. Díaz Román**  
A Coruña, febrero 2004



## UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**D<sup>a</sup>. Nieves Doménech García**, Investigadora del Programa de Promoción de la Investigación del Ministerio de Sanidad y Consumo en el Complejo Hospitalario Juan Canalejo-Marítimo de Oza de A Coruña, y **D. Rafael Mañez Mendiluce**, Jefe del Servicio de Medicina Intensiva del Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona.

### CERTIFICAMOS:

Que **Tomás M. Díaz Román**, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo: **“Análisis *in vitro* de la respuesta citotóxica humoral en el modelo de xenotrasplante cerdo/ primate”**.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de Doctor en Medicina.

En A Coruña, a 20 de Febrero de 2004

Dra. Nieves Doménech García

Dr. Rafael Mañez Mendiluce



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**D. Luis M. Antón Aparicio**, Doctor en Medicina y Profesor Titular del Departamento de Medicina en la Universidad de A Coruña,

**CERTIFICA:**

Que el licenciado en medicina y cirugía **Tomás M. Díaz Román** ha realizado bajo la dirección de los doctores **Nieves Doménech García** y **Rafael Máñez Mendiluce** el trabajo titulado: “*Análisis in vitro* de la respuesta citotóxica humoral en el modelo de xenotrasplante cerdo/ primate”.

Revisado el presente trabajo como tutor de D. Tomás M. Díaz Román quedo conforme con su presentación para ser juzgado como tesis doctoral.

Dr. Luis Antón Aparicio

A Coruña 20 febrero 2004



## PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Parte de este trabajo ha sido publicado y/o presentado en las siguientes revistas y reuniones.

- Díaz TM, Mañez R, Moscoso I, López E, Ortega D, Doménech N. Monitoring cytotoxicity against cells after transplantation using two-color fluorescence viability assay. *Transplantation Proc.* 2003; 35:2047.
- Díaz TM, Mañez R, Moscoso I, Lopez E, Centeno A, Doménech N. An FDA/PI flow cytometry assay of complement-mediated cytotoxicity of antibodies generated during xenotransplantation. *Cytometry* 2004 (en impresión)
- Díaz TM, Moscoso I, Ortega D, Mañez R, Doménech N. Low molecular weight heparin and GAS 914 inhibit baboon serum cytotoxicity against pig cell detected by flow cytometry viability assay.
  - VI Congress of International Xenotransplant Association. Chicago, USA. (sep-oct 2001). *Xenotransplantation.* 2001; 8:64.
  - American Transplant Congress 2002. Washington, USA (may 2002) *Am J Transplantation.* 2002; 2 suppl 3:208.
  - XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Valladolid. (jun 2002). *Inmunología.* 2002; 21 suppl 1:92
  - Congreso de la Societat Catalana de Transplantament. Barcelona. (feb 2003).
- Díaz TM, Mañez R, Moscoso I, López E, Ortega D, Doménech N. Presence of cytotoxic xenoantibodies directed against antigens found on pig nucleated cells and absent on red cell in pig to baboons xenotransplantation.
  - American Transplant congress 2003. Washington DC, USA. (may-jun 2003). *Am J Transplantation.* 2003; 3 suppl 5:416
  - VII Congress of International Xenotransplant Association. Glasgow. UK. (sep-oct 2001). *Xenotransplantation* 2003;10:514

- Díaz TM, Mañez R, Moscoso I, López E, Ortega D, Doménech N. The serum level of xenoantibodies, and hDAF or Gal expression on pig cell, modulate the protection given by hDAF to complement mediated damage in pig-to-baboon xenotransplantation model.
  - XXX congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Santander (mayo 2004). Inmunología. 2004; 23 suppl 1:140
  - XX International Congress of the Transplantation Society. Viena. Austria. (sep 2004).

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco la participación de todas las personas que estuvieron relacionadas directa o indirectamente con la realización de este trabajo:

Al Dr. Rafael Mañez, por haberme dado la oportunidad de incorporarme al grupo de xenotrasplante y abrir la posibilidad de este doctorado. A la Dra. Nieves Doménech, por permitirme llevar a cabo los experimentos con la independencia y los recursos necesarios, por su apoyo en el trabajo y la acertada revisión de los manuscritos.

A los integrantes del grupo de xenotrasplante, en particular a la Lic. Isabel Moscoso, las técnicas Dolores Ortega e Isabel Santamarina por su contribución en la realización de los experimentos, a Purificación Filgueira y M<sup>a</sup> José Sánchez por su colaboración. A los doctores E. López y A. Centeno que fueron imprescindibles para la obtención de las muestras.

A mis compañeros del grupo de reumatología y de oncología, E Maneiro, M<sup>a</sup> Carmen, M<sup>a</sup> Mar, Ángeles, M<sup>a</sup>. J. López Armada, J Pinto, I Fuentes, B. Caramés, B. Lema, y los más nuevos Berta, Marcos, Sergio, Tamara, Daniel, Cristina y Rosa. A Pilar por su valiosa ayuda durante todo este tiempo. A la Lic S. Pértega, E. Rendal, al grupo del laboratorio de Ciencias de la Salud, a J. M. Ligós y J. M. Cortés de BD.

A los doctores Francisco Blanco, director de la unidad de investigación del hospital Juan Canalejo, F. J. del Toro y L. Antón Aparicio, del Departamento de Medicina de la Universidad de la Coruña, por el apoyo y consideración hacia mi trabajo

A mis profesores cubanos M. E. Faxas, C. A. García, R. Rivero y muchos otros, que me iniciaron en la investigación inmunológica. A L. Osorio y M. Jondal, del Instituto Karolinska de Suecia, por la puesta al día en esta ciencia.

A mi familia de Cuba y de España, a Teresa por respetar el tiempo que le he dedicado a este trabajo y a mi hijo Tomás quien, por el contrario, poco le importó robarme algunas horas y con el que estuve en buena complicidad.

A todos muchas gracias.

# ÍNDICE

## I- INTRODUCCIÓN

<b>1. Antecedentes y evolución del xenotrasplante.....</b>	<b>1</b>
1.1. Relevancia del problema.....	2
1.2. Las barreras actuales al xenotrasplante.....	3
1.2.1. Los obstáculos fisiológicos al xenotrasplante.....	4
1.2.2. Las limitaciones de los modelos.....	5
1.2.3. Los riesgos de infección.....	6
1.2.4. Otras consideraciones.....	7
<b>2. La respuesta inmune del receptor al xenoinjerto.....</b>	<b>8</b>
2.1. Formas clínicas de respuestas al xenotrasplante.....	8
2.2. Mediadores de la respuesta inmune.....	10
2.2.1. Mediadores humorales.....	10
2.2.2. Mediadores celulares.....	13
2.3. Organización de la respuesta.....	17
<b>3. Prevención del rechazo xenogénico.....</b>	<b>21</b>
3.1. Depleción de Anticuerpos.....	21
3.2. Neutralización y supresión de la producción de xenoanticuerpos.....	22
3.3. Administración de sustancias que inhiben el complemento.....	24
3.4. Órganos donantes modificados genéticamente.....	26
3.5. Inducción de tolerancia al xenotrasplante.....	28
3.6. Otros inmunosupresores.....	30
<b>4. Evaluación de la citotoxicidad humoral.....</b>	<b>30</b>
4.1. Métodos experimentales de evaluación citotóxica.....	31
4.2. La expresión de los resultados en estudios funcionales de citotoxicidad.....	33
<b>5. Justificación del estudio.....</b>	<b>35</b>



## II- OBJETIVOS

<b>1. Objetivo General.....</b>	<b>37</b>
<b>2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>37</b>

## III- MATERIALES Y MÉTODOS

<b>1. Material biológico empleado.....</b>	<b>38</b>
1.1. Animales.....	38
1.2. Muestras de sueros.....	38
1.3. Células aisladas de sangre total.....	39
1.4. Líneas y cultivos celulares.....	40
<b>2. Soluciones y reactivos.....</b>	<b>41</b>
2.1. Empleados en citometrías.....	41
2.2. Empleados en ensayos hemolíticos dependientes de complemento (EHC).....	41
2.3. Empleados en ensayos de electroforesis y Western Blot (WB).....	41
2.4. Usos varios.....	43
<b>3. Procedimientos y ensayos.....</b>	<b>43</b>
3.1. Procedimiento de absorción de sueros de babuinos con hematíes porcinos.....	43
3.2. Ensayos de citotoxicidad.....	44
3.2.1. Ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento por citometría de flujo. (CCCF).....	44
3.2.2. EHC.....	46
3.2.3. Ensayo de citotoxicidad por liberación de Cr <sup>51</sup> .....	47
3.3. Ensayos de inmunofluorescencia.....	47
3.3.1. Detección de antígenos $\alpha$ Gal por marcaje directo.....	48
3.3.2. Detección de moléculas DAF por marcaje indirecto.....	48



3.3.3. Detección de anticuerpos totales anti-células porcinas.....	48
3.4. Cuantificación de anticuerpos anti- $\alpha$ Gal por método inmunoenzimático (ELISA).....	49
3.5. Detección de xenoantígenos porcinas por ensayos de inmunoprecipitación y WB.....	50
3.5.1. Obtención de los lisados biotinilados.....	50
3.5.2. Inmunoprecipitación.....	51
3.5.3. Electroforesis transferencia y revelado antígenos.....	51
<b>4. Diseño de los estudios.....</b>	<b>52</b>
4.1. Caracterización del método de exploración de la citotoxicidad humoral por citometría de flujo y validación del modo de expresión de los resultados.....	52
4.2. Detección de xenoanticuerpos dirigidos a antígenos expresados en células nucleadas ausentes en hematíes.....	53
4.3. Estudios de protección de DAF humano (hDAF), expresado en células de cerdos transgénicos sobre la citotoxicidad de los sueros de babuinos.....	54
<b>5. Procesamiento y análisis estadísticos de los datos.....</b>	<b>55</b>
5.1. Definición de ULS y modelos matemáticos.....	55
5.2. Procedimientos estadísticos generales.....	57
<b>6. Relación general de los babuinos usados para la obtención de muestras en los distintos experimentos: tipo de trasplante, tratamiento y supervivencia.....</b>	<b>58</b>

## IV- RESULTADOS

<b>1. Diseño y caracterización del método CCCF.....</b>	<b>59</b>
1.1. Descripción de las curvas de citotoxicidad obtenidas en CCCF con doble marcaje. Correlación entre las vías endógena y exógena.....	59
1.2. Efectos de la cuantificación por PC <sub>1</sub> ó PC <sub>2</sub> en el cálculo de ULS .....	62
1.3. Comparación de los resultados de CCCF con otros métodos de detección de citotóxicidad.....	64
1.4. Grado de ajuste de las curvas generadas en los distintos modelos matemáticos empleando CCCF.....	67
1.5. Análisis de la sensibilidad funcional del método CCCF y de su posible aplicación en otras dianas celulares.....	70
 <b>2. Xenoanticuerpos dirigidos a epitopes expresados en células nucleadas ausentes en hematíes porcinos.....</b>	 <b>73</b>
2.1. Citotoxicidad en los sueros pre-trasplante y en el momento del rechazo xenogénico humoral agudo (RXHA) analizada por EHC y CCCF exógeno.....	73
2.2. Citotoxicidad en las muestras pre-trasplante y correspondientes al RXHA medidas por EHC o CCCF después de la absorción de los sueros con eritrocitos de cerdo normal.....	75
2.3. Presencia residual de xenoanticuerpos y de Acs anti- $\alpha$ Gal en los sueros absorbidos.....	78
2.4. Identificación de los xenoantígenos reconocidos por los xenoanticuerpos de babuinos mediante estudios de inmunoprecipitación y WB.....	82
 <b>3. Capacidad protectora de la molécula hDAF, expresada en células de cerdos transgénicos, sobre la citotoxicidad de los sueros de primates.....</b>	 <b>84</b>

3.1. Protección de la molécula hDAF expresada en un cerdo transgénico frente a la citotoxicidad producida por los sueros de babuinos pre-trasplantados.....	84
3.2. Protección de la molécula hDAF expresada en un cerdo transgénico frente a la citotoxicidad producida por diferentes sueros de babuinos trasplantados.....	86
3.3. Correlación entre la protección frente al daño citotóxico aportado por la presencia del transgén hDAF y la existencia de Acs específicos anti- $\alpha$ Gal en los sueros de los babuinos.....	89
3.4. Variabilidad en el grado de protección conferida por el transgén hDAF en distintos cerdos frente a la actividad citotóxica inducida de los sueros de primates.....	90
3.5. Influencia del grado de homología de especie entre el complemento y la molécula protectora DAF en la medida de la citotoxicidad humoral.....	93

## **V- DISCUSIÓN**

1. Validez del método de detección de la citotoxicidad humoral por CCCF.....	97
2. Participación en la citotoxicidad humoral de xenoanticuerpos presentes en los sueros de los primates no detectados en los ensayos hemolíticos clásicos frente a hematíes porcinos.....	103
3. Papel del complemento en el xenorechazo de órganos de cerdos transgénicos hDAF.....	111

<b>VI- CONCLUSIONES.....</b>	<b>117</b>
------------------------------	------------

<b>VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>119</b>
---	------------



## **ABREVIATURAS**

Acs: Anticuerpos.

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

APC: Células presentadoras de antígenos.

AUC: Área bajo la curva.

CCCF: Ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento por citometría de flujo.

CFD: Solución buffer comercial para dilución del complemento equivalente a buffer veronal sódico.

CPM: Cuentas por minutos.

Daf: Diaceteto de fluoresceína.

DAF: Molécula reguladora del complemento CD55. Puede ser hDAF para referirse a la variante humana.

DO: Densidad óptica.

EHC: Ensayo hemolítico dependiente de complemento.

EPE: Modelo exponencial con asíntota fijada a partir de dato experimental de máxima lisis.

EPI: Modelo matemático exponencial con asíntota calculada por método iterativo.

FAS: Receptor para la inducción de apoptosis CD95

Fc: Fracción cristizable de las inmunoglobulinas que incluye las regiones constantes de la misma.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FT: Factor tisular.

HBSS: Solución salina de Hanks.

ICAM: Molécula adhesión intercelular, puede ser 1, 2, 3.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

Ig: Inmunoglobulina.

ILs: Interleucinas, puede añadirse un número para referirse a una en particular IL-1, IL-2...etc.

INF: Interferón puede ser  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ .

IP: Ioduro de Propidio.

LFA: Molécula asociada a función leucocitaria.

LS: Solución amortiguadora para lisado.

MAC: Complejo de ataque a membrana del complemento.

MCP: Molécula reguladora del complemento CD46

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

MFI: Mediana de intensidad de fluorescencia obtenida en el análisis citométrico.

NK: Células citotóxicas naturales.

PBL: Linfocitos sangre periférica.

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos.

PC: porcentaje de citotoxicidad.

PERV: Retrovirus Endógeno Porcino.

RCA: Proteínas Reguladoras de la Activación del Complemento.

rpm: revoluciones por minuto.

RXHA: Rechazo Xenogénico Humoral Agudo.

SBN: Suero de babuino normal (obtenido de una mezcla de varios sueros normales).

SCN: Suero de cerdo normal (obtenido de una mezcla de varios sueros normales).

SFB: Suero fetal bovino.

SHN: Suero humano normal (obtenido de una mezcla de varios sueros normales).

SLAP: Sistema leucocitario antigénico porcino

TCR: Receptor de células T.

TNF: Factor de necrosis tumoral, puede ser  $\alpha$  o  $\beta$

UL: Unidad Lítica.

ULR: Unidad lítica relativa.

VK: Referido a la ecuación de Von Krogh.

VLA: Antígeno de activación tardío.

WB: Western Blott.

$\alpha$ Gal: Polisacáridos antigénicos con la estructura Gal  $\alpha$ 1-3 Gal.



## ***INTRODUCCIÓN***

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **1. Antecedentes y evolución del xenotrasplante.**

El trasplante de órganos o tejidos entre diferentes especies, que se conoce hoy como xenotrasplante, es una idea tan antigua como la del alotrasplante, es decir, la de los trasplantes realizados entre individuos pertenecientes a una misma especie. Hace más de doscientos años ya se experimentó trasplantando piel de ranas ó sangre de caprinos a humanos con diferentes dolencias. Sin embargo, los primeros informes de trasplantes con órganos sólidos son de principios del siglo xx, cuando los cirujanos adquirieron habilidades para anastomosar los extremos libres de los vasos sanguíneos. En 1906 se realizaron los primeros xenotrasplantes renales<sup>1</sup>, pero el poco éxito obtenido con los mismos frenó el desarrollo de más estudios y retardó su avance por décadas.

A principios de 1960 el desarrollo de la inmunosupresión farmacológica permitió que los alotrasplantes renales mejoraran la supervivencia. Se renovó el interés por el uso de animales porque el concepto de muerte cerebral no existía y la posibilidad de acudir a órganos humanos estaba limitada a un número escasos de cadáveres. A partir de entonces se xenotrasplantaron riñones, hígados y corazones por un periodo de tiempo variable hasta alcanzar un total de 53 ensayos en 1996, de ellos, 46 se habían realizado con órganos procedentes de primates no humanos y 8 se habían obtenido de otros mamíferos<sup>2</sup>. La supervivencia promedio para los primeros fue algo menor de 6 semanas, excepto un paciente con un doble trasplante renal de chimpancé que logró sobrevivir 9 meses en 1969<sup>3</sup>, en general el rechazo de los órganos procedentes de otros mamíferos no primates se produjo en minutos u horas<sup>2</sup>.

El aumento en la disponibilidad de órganos para el alotrasplante debido a la aceptación del concepto de muerte cerebral a finales de los años 60, la aparición de tratamientos alternativos como la hemodiálisis, y las fuertes reacciones de rechazo en varios modelos xenogénicos, produjeron un declive en el número de intentos de xenotrasplantes hasta que, a mediados de los años 80<sup>1,4</sup>, se impuso de nuevo la

necesidad de órganos para suplir las demandas de un tratamiento que era cada vez más efectivo en la práctica clínica. El aumento de la demanda trajo paralelamente el intenso desarrollo de trabajos experimentales que se han mantenido durante los últimos 15 años. Durante este tiempo, se han puesto de manifiesto los obstáculos más trascendentales para la aceptación del xenotrasplante y se han generado posibles soluciones alternativas. Sí en 1993 el número total de artículos recogidos en Medline referidos al tema de xenotrasplante era aproximadamente de 9100, en el momento actual, diez años después, la cifra casi se dobla con 17700, lo que demuestra el incremento en la atención que ha estado recibiendo el tema<sup>5</sup>.

### **1.1. Relevancia del problema**

El trasplante de órganos ha sido un éxito rotundo de la medicina. Un procedimiento que solo era experimental 30 años atrás, es ahora el tratamiento preferido para solucionar muchos fallos del riñón, corazón, hígado, pulmones, intestinos e incluso páncreas. Sin embargo, el número de donantes es escaso, así en Estados Unidos se estima que sólo se llevan a la práctica aproximadamente entre el 5 - 10% de los trasplantes que podrían realizarse. En los últimos diez años, en ese país el porcentaje de trasplantes realizados se incrementó en un 30%, mientras que el número de candidatos previstos para recibir tratamiento creció en 100% y puede que la estadística no lo recoja todo<sup>4</sup>. Se calcula que un nuevo nombre se añade a las listas de espera cada 18 minutos. El promedio de espera para un trasplante dependiendo del órgano puede estar entre 207 días (corazón) y algo más de 2 años (corazón-pulmón en bloque)<sup>6</sup>.

En España, la situación es similar a lo anterior debido al incremento de pacientes que son candidatos a trasplantes de distintos órganos, aunque con índices más favorables en algunas localizaciones como la renal. Se estima que de los 31000 trasplantes renales y 11500 hepáticos que se hacen al año en el mundo, en España se realizan más del 6% y el 11%, respectivamente. En el caso del trasplante cardíaco ó del hepático dado que no existe la posibilidad de tratamientos sustitutivos y la alternativa al trasplante es la



muerte, la situación puede ser más grave. En España la indicación de trasplante hepático creció en un 200% en los últimos años, por lo que a pesar de haberse aumentado el número de trasplantes que se efectúan la lista de espera crece, la mortalidad es del 9% anual y el tiempo de espera se ha incrementado al 100% en los últimos 10 años<sup>7</sup>.

Una solución a la demanda de órganos para trasplantes en humanos puede ser el uso de órganos procedentes de otras especies. Además, se han señalado algunas otras ventajas teóricas con el uso de este procedimiento: la planificación del momento adecuado de la operación, la extensión de posibilidades terapéuticas a otras enfermedades no previstas, la resistencia de especies no humanas a padecer enfermedades que atacan a varios grupos (hepatitis B, SIDA) ó la oportunidad de manipular genéticamente los órganos donantes para favorecer la respuesta del receptor, entre las principales.

## **1.2. Las barreras actuales al xenotrasplante**

A pesar del potencial que el xenotrasplante ofrece y del conocimiento acumulado en los últimos años, existe un acuerdo general sobre la imposibilidad actual de su aplicación clínica en humanos hasta que se resuelvan una serie de barreras que centran la atención de los investigadores en el tema. El grupo de trabajo de xenotrasplante del “National Heart, Lung, and Blood Institute”, integrado por un amplio número de expertos en el tema, se reunió en Bethesda. EEUU en Julio 2001 y ordenó los posibles problemas según las prioridades siguientes<sup>8</sup>:

- 1- La respuesta inmune del receptor al injerto.
- 2- Los obstáculos fisiológicos al xenotrasplante.
- 3- Las limitaciones de los modelos.
- 4- Los riesgos de infección.

Estas tres últimas consideraciones junto con otras de tipo ético se comentarán brevemente a continuación, mientras que posteriormente se detallarán con mayor

amplitud los aspectos de tipo inmunológicos que es el punto principal del trabajo realizado en esta tesis.

### **1.2.1. Los obstáculos fisiológicos al xenotrasplante.**

Estos obstáculos han sido considerados por algunos autores como el factor determinante en el éxito del xenotrasplante. El problema se plantea por las posibles incompatibilidades bioquímicas entre las especies dispares a tratar. Existen diferencias entre variables fisiológicas que pueden corregirse u optimizarse al máximo, pero hay decenas o centenares de proteínas y procesos que pueden afectarse por las diferencias moleculares entre los humanos y otras especies difíciles de compatibilizar. Esto podría afectar no solo la funcionalidad de los injertos sino la propia supervivencia de los mismos<sup>9</sup>.

En algunos casos parece que los problemas pueden solventarse. El tamaño del corazón podría adecuarse convenientemente entre la especie donante y la receptora, el riñón del cerdo es capaz de realizar básicamente la función de producir orina en primates no humanos y la insulina porcina ha demostrado su efectividad para el control de la glicemia en diabéticos durante mucho tiempo. Sin embargo otros órganos requieren compatibilidades más estrictas para el éxito del tratamiento. Así, en injertos de médula ósea de cerdos a ratones SCID, las células progenitoras multipotenciales tienen limitada su implantación o desarrollo por la inoperancia de los factores de crecimiento implicados en el proceso<sup>10,11</sup>. De forma similar, la deficiencia en el control de los factores de la coagulación por tales incompatibilidades, incrementa la susceptibilidad a fenómenos de coagulación vascular diseminada observada en varios modelos incluyendo experimentos “in vivo” o “in vitro” cerdo / humano<sup>12</sup>. Es de esperar que en órganos metabólicamente más complejos, como el hígado por ejemplo, este aspecto tenga mayor importancia. En cualquier caso este es un problema difícil de evaluar correctamente con la experiencia actual, entre otras cosas, porque el reducido número de xenotrasplantes realizados en humanos sobrevivieron muy poco tiempo<sup>2</sup>.



### **1.2.2. Las limitaciones de los modelos.**

Los modelos en xenotrasplante se dividen en dos grandes grupos de acuerdo a la combinación de las especies participantes. En general especies mas relacionadas filogenéticamente como los humanos y los chimpancés, o las ratas y los ratones, no tienen respuestas de rechazos tan agudas como las observadas entre primates no humanos y cerdos. En 1970<sup>13</sup> se acuñó los términos de concordantes y discordantes para distinguir entre las dos situaciones. Hoy se sabe que las respuestas de rechazo no siguen exactamente distancias filogenéticas y que otros factores, como la presencia de anticuerpos (Acs) pre-formados receptor anti-donante pueden influir sobre las mismas. Así, la combinación de animales zoológicamente cercanos como ratas y hamster se comporta como modelo discordante si los órganos procedentes de ratas son trasplantados a un hamster produciéndose un rechazo vigoroso y como modelo concordante si el trasplante se realiza en el sentido opuesto<sup>14</sup>.

La elección del modelo discordante con primates no humanos como receptores y cerdos como fuente de órgano (cerdo / primate) se produce por la similitud anatómica y funcional entre las dos especies, y por la necesidad de estudiar reacciones inmunes presentes en el hombre, mediadas por Acs naturales contra xenoantígenos oligosacaridos expresados en las membranas de las células de los cerdos y otros mamíferos.

La elección del cerdo, como donante obedece también a las limitaciones de los propios primates no humano para ser utilizados como fuentes de órganos, que incluyen su lenta reproducción, los peligros de extinción y de transmisión de enfermedades infecciosas entre otras. Los cerdos en cambio son animales conocidos desde hace mucho tiempo por su importancia alimentaria para el hombre con algunas ventajas añadidas concernientes a su facilidad para reproducirse, alimentarse y manipular en cautiverio.

Sin embargo, mientras hay investigadores que consideran que los modelos en los que se utilizan como receptores primates no humanos (babuinos principalmente) pueden

ser buenos predictores de la posible evolución clínica en humanos, otros creen que no representan verdaderamente lo que pudiera suceder en xenotrasplantes a humanos. Las cuestiones principales que se debaten son<sup>8</sup>:

- a) Las manipulaciones genéticas llevadas a cabo en cerdos para prolongar la supervivencia de injertos pudieran no funcionar óptimamente en los modelos de primates no humanos.
- b) Los modelos pueden desarrollar inmunidad contra las proteínas humanas transfectadas a los cerdos. Por ejemplo Los babuinos pueden desarrollar Acs anti-DAF humano.
- c) Las tecnologías diagnósticas y farmacológicas desarrolladas para humanos pudieran no ser óptimas para el resto de los primates. Por ejemplo, los medicamentos o Acs anti-CD3 no reconocen igualmente dianas en humanos y otras especies.
- d) En el caso del uso de animales los cuidados post-operatorios requieren la utilización de anestésicos y favorecen la existencia de riesgos adicionales que en el humano no se consideran por su cooperación en el tratamiento.
- e) Por último, la respuesta inmune contra los órganos trasplantados varía entre especies y la respuesta de monos, ratas, etc, frente a tejidos porcinos puede ser distinta e incluso mayor en unos u otros respecto al humano.

### **1.2.3. Los riesgos de infección.**

Las infecciones son complicaciones rutinarias de los alotrasplantes parcialmente debidas a la inmunosupresión y/o a la transferencia de agentes infecciosos del donante. En los xenotrasplantes esta última vía puede reducirse porque los animales pueden ser obtenidos en sistemas aislados de gérmenes y vigilarse estrechamente durante su crecimiento. Una excepción podría ser la presencia de retrovirus endógenos integrados en el genoma de los cerdos (PERV) que pudieran ser transmitidos al hombre a pesar de estos cuidados.



El mayor peligro que podría entrañar la presencia de estos virus es que el salto del cerdo al hombre implicase la diseminación de la infección en la especie humana. Hasta la fecha se ha comunicado la transmisión porcino-humana de PERV en cultivos celulares<sup>15</sup>, pero su búsqueda en pacientes o grupos de riesgo no ha dado resultados positivos<sup>16,17</sup>. La tendencia es considerar que si bien no debe reducirse la importancia de este problema para la salud pública, los riesgos de infección deben seguir estudiándose en los modelos animales, pero no deben ser un obstáculo que detenga el avance del xenotrasplante a la clínica<sup>2,8</sup>.

#### **1.2.4. Otras consideraciones.**

Son varios los aspectos que relacionan los trasplantes y los preceptos éticos o costumbres sociales. En ellos están implicados el acto quirúrgico, las fuentes de obtención de órganos o la utilización de ciertos animales. A continuación se comentan brevemente algunas consideraciones a este respecto.

Es conocido que para culturas como la de algunos países asiáticos, la donación de un órgano después de la muerte no es un acto habitual, lo que reduce la disponibilidad de órganos en esos países. Estos países intentan recibir un órgano en países de culturas más abiertas pero se mantienen en una situación desventajosa porque las políticas de salud para no-residentes y extranjeros dificultan las posibilidades de acceso a órganos. Los xenotrasplantes podrían aliviar esta situación. Otros problemas incluyen la utilización de primates no-humanos como donantes debido a que su número es cada vez más escaso, el carácter psicológicamente más afectivo de estos (que promueve las consecuentes medidas de protección por parte de gobiernos y organizaciones protectoras de animales), el peligro de aparición de nuevos agentes infecciosos y la transmisión de algunas enfermedades, contemplando también la posibilidad que el hombre pueda afectar a especies animales con agentes emergentes o desconocidos para ellos.

## 2. La respuesta inmune del receptor al xenoinjerto en el xenotrasplante.

Como se señaló previamente, el rechazo y los problemas concernientes a la respuesta inmune en general son quizás los aspectos que más atención han recibido en los trabajos experimentales en xenotrasplante. El análisis que se muestra a continuación esta dirigido principalmente a la respuesta inmune humana que puede producir tras un xenotrasplante y a los modelos experimentales que más interesan por su posible aplicación clínica, en especial al utilizado en esta tesis, el modelo cerdo / primate no humano.

### 2.1. Formas clínicas de respuestas al xenotrasplante.

#### *¿Cuanta severidad hay en la reacción al xenoinjerto?*

En general, una respuesta inmune puede ser tan sutil que llegue a ser solo posible su detección en pruebas de laboratorios sin repercusión en la salud del individuo, esta pase “inadvertida” para el organismo y quizás sea neutralizada de manera sub-clínica, como ocurre con ciertas crioglobulinas dirigidas contra antígenos de células sanguíneas o contra microorganismos poco inmunogénicos. También la respuesta inmune puede ser ligera pero persistente produciendo problemas a más largo plazo, como sucede con muchos autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes. Por el contrario, la respuesta puede tener una forma muy evidente e incluso altamente agresiva en su presentación<sup>18</sup>. La respuesta al xenotrasplante probablemente puede incluir las tres formas de respuesta en determinados momentos.

Las formas clínicas de respuesta contra órganos trasplantados constituyen los rechazos y estos pueden tener gradaciones en el tiempo, en la intensidad y en la forma de aparecer. Los rechazos **hiperagudos** se establecen en minutos después de la revascularización y suelen ser devastadores, aunque depende del tipo de órgano trasplantado. En general los rechazos hiperagudos se caracterizan por presentar



hemorragia, edema, infarto del tejido intersticial y trombosis de los vasos<sup>19</sup>. Los rechazos hiperagudos son la forma natural de evolución de los trasplantes discordantes.

Para las combinaciones discordantes ahora es posible prevenir el rechazo hiperagudo por varias vías. Si se consigue evitarlo tanto en éstos como en los injertos concordantes puede iniciarse otra vigorosa reacción que sucede entre los dos o tres días a algunas semanas tras el trasplante, (más rápido que en los alotrasplantes) con menores signos de hemorragia aunque con significativa trombosis, isquemia y necrosis fibrinoide, e incluso en algunas ocasiones puede verse un ligero infiltrado celular acompañado de células NK y macrofágicas; este tipo de rechazo ha recibido varios nombres: **rechazo vascular agudo, rechazo xenogénico retardado o rechazo xenogénico humoral agudo (RXHA)**. La variación terminológica guarda relación con la ambigüedad que existe en el conocimiento de sus mecanismos, en este sentido el modelo de cerdo a primate no humano es el que mayor información ha aportado <sup>20</sup>. Como se observa en las dos formas anteriores de rechazo, las evidencias patológicas apuntan sobre todo a la presencia de mecanismos humorales de respuestas inmunológicas.

Debido a las dificultades en sobrepasar el RXHA existe controversia sobre la existencia real de un rechazo crónico<sup>21</sup> en el xenotrasplante. En los estudios de alotrasplante el **rechazo crónico** es un fenómeno celular en el que pasadas las primeras oleadas celulares aparecen los procesos de degeneración e involución cicatrizal tardíos. En trabajos sobre xenotrasplante, este término es difícil de aplicar lo cual es lógico si se tiene en cuenta la corta supervivencia de los modelos lo que nos aleja las posibilidades de observación. Teóricamente, hay sobradas razones para la existencia en ellos de rechazos celulares y crónicos, y así lo indican numerosos trabajos "in vitro" (revisado en Brouard S,<sup>22</sup> y Dorling A,<sup>23,24</sup>) de los que posteriormente se harán algunos comentarios al respecto.



Un estado de resistencia al daño humoral puede aparecer en animales trasplantados que han sido deplecionados transitoriamente de Acs naturales anti-órgano del donante ó en los que ha sido inhibida la acción del complemento. Después de estos procesos no se observa respuesta ni producción de daño, aún en presencia de niveles de Acs similares a los existentes en el momento pre-trasplante. El término propuesto para denotar este estado inmunológico todavía no bien comprendido es el de **la acomodación**<sup>25,26</sup>.

## **2.2. Mediadores de la respuesta inmune.**

### *¿Cómo se lleva a cabo la respuesta?*

Desde el punto de vista inmunológico el ser humano cuenta con los mismos recursos para atacar una infección bacteriana que a un trasplante, la manera de organizarlos es la que cambia, esta forma de organización depende de varios factores pero especialmente de los antígenos.

Antes de analizar la forma mas probable en que suceden la respuestas de rechazo (hiperagudo, RXHA, celular), primeramente se describiran los elementos que la integran.

### **2.2.1. Mediadores humorales**

- Antígenos y tejidos. Cuando se realizan transplantes de órganos sólidos vascularizados, el endotelio vascular es la primera barrera sólida con que se encuentran los elementos de la respuesta inmune del huésped a su paso por el órgano donado. Un hallazgo fundamental del siglo pasado, para el conocimiento del xenotrasplante, fue la distinción antigénica entre los tejidos de algunos primates no-humanos y del hombre frente al de otros mamíferos inferiores. La diferencia fundamental está basada en la capacidad para expresar oligosacaridos terminales del tipo Galactosa  $\alpha$ 1,3 Galactosa ( $\alpha$ Gal) en las

células de los mamíferos inferiores, incluyendo los endotelios de sus vasos sanguíneos y su ausencia en el humano, simios y monos del Viejo Mundo. Por ejemplo en el cerdo se ha estimado la presencia de hasta  $10^7$  epitopes de este antígeno<sup>27</sup>. Tras este hallazgo, la existencia de grandes cantidades de Acs naturales pre-formados dirigidos contra esos determinantes<sup>28</sup> se postuló como causa principal de rechazo en modelos cerdos / primates<sup>29,30</sup>. Debido a que entre el 85 – 95% de los Acs naturales circulantes anti-cerdos en humanos son dirigidos a epitopes  $\alpha$ Gal<sup>29-31</sup> este se ha considerado como el epítope inmunodominante de la respuesta humoral xenogénica.

Aunque la mayoría de los Acs naturales pre-formados parecen unirse a los antígenos  $\alpha$ Gal y su eliminación previene el rechazo hiperagudo, estos azúcares no son las únicas moléculas antigénicas para los Acs humanos<sup>32</sup>. Los epitopes  $\alpha$ Gal aparecen conjugados a glicoproteínas antigénicamente complejas como algunas moléculas de adhesión y otras cuyas funciones se desconocen<sup>33-35</sup>.

Por otra parte, los tejidos endoteliales sobre los cuales descansan estos antígenos son también un marco vital de elementos que interactúan durante las respuestas inmunológicas. Dos tipos de activación se han descrito en los xenoinjertos: activación endotelial tipo I y activación endotelial de tipo II. Ambos tipos se vinculan con los fenómenos de rechazo hiperagudo o RXHA, respectivamente, como veremos más tarde.

- Los Anticuerpos. Los Acs anti- $\alpha$ Gal que componen la gran mayoría de Acs naturales presentes en primates no humanos y en el hombre, al igual que ocurre con otros Acs naturales, no existen al momento del nacimiento sino que es muy probable que se desarrollen como resultado de la exposición a bacterias ambientales que compartan epitopes glucídicos similares. Son de clase IgM principalmente y constituyen hasta el 4% del total de la IgM humana, aunque también puede haber IgG<sub>3</sub> o IgA. Ninguna de estas clases de Acs parece



correlacionar su nivel con la exposición ambiental a productos derivados de animales<sup>36</sup>.

Los Acs anti- $\alpha$ Gal naturales pertenecen a un grupo de Acs como las isohemaglutininas de los grupos sanguíneos ABO, derivados al parecer de subpoblaciones B<sub>1</sub> timo-independientes, auto-renovables, y en buena parte polireactivos<sup>37</sup>, pero con baja afinidad, siendo su rango de unión de  $10^{-4}$  aproximadamente<sup>38</sup>. Aunque no hay una certeza total parece existir heterogeneidad de idiotipos, ya que para algunos autores una parte de estos Acs naturales son monoreactivos anti- $\alpha$ Gal y definitivamente importantes en las reacciones de rechazo<sup>21</sup>. Además de los Acs anti- $\alpha$ Gal naturales pueden existir otras especificidades inducidas pos-trasplante pero ello es motivo de estudio y controversia<sup>4,33-35,39,40</sup>.

- El Complemento El complemento es uno de los mecanismos efectores más potentes del sistema inmune. En el trasplante, sus acciones se realizan mediante la lisis directa de células trasplantadas por el complejo de ataque a membranas (MAC), promoviendo la inflamación del tejido comprometido en el trasplante por participación de anafilotoxinas o productos derivados de la activación, y participando en la activación de los endotelios vasculares trasplantados. Para llevar a cabo sus efectos el complemento necesita activarse bien por la vía clásica o por la vía alterna y ambas vías participan en el rechazo a xenoinjertos.

La vía clásica ocurre por activación del primer componente del sistema el C1q y los inmunocomplejos formados por los Acs anti-órganos, básicamente las IgM (grandes activadoras de complemento) naturales anti- $\alpha$ Gal ya mencionadas<sup>41</sup>, y sus antígenos.

La vía alterna es regulada por el factor H, que inhibe la asociación del factor C3b con el factor B en las superficies homologas (pero no en las heterólogas)



para formar la C3 convertasa al comienzo del proceso. La presencia además de proteínas reguladoras de complemento en estas superficies, DAF, MCP, CD59 van a inhibir la cascada a distintos puntos de la vía dependiendo de cierta restricción homóloga<sup>42</sup>. Ello indica que la vía alternativa puede ser una barrera primaria en xenotrasplantes. La activación de la vía alternativa es un hecho que conduce a rechazo hiperagudo en algunos modelos: cobayo / rata<sup>43</sup>, conejo / cerdo<sup>44</sup> y gato / conejo<sup>45</sup>. Sin embargo en modelos de primates /cerdo, la vía alternativa no parece participar, al menos, en la iniciación del rechazo hiperagudo<sup>46</sup> aunque esto puede discutirse.

En cualquier caso, antes de iniciar el MAC, la vía clásica y la vía alternativa convergen en un ciclo de amplificación para ambas vías que potencia su acción significativamente. El rechazo hiperagudo no se concibe sin la participación de complemento, Sin embargo en RXHA puede haber participación del complemento o bien puede ser un evento independiente del mismo<sup>1,4,21</sup>.

### **2.2.2. Mediadores celulares.**

Durante 1970 hasta algo más de 1980, la idea predominante sobre la respuesta celular que se producía en el xenotrasplante era la de una respuesta débil y fácilmente suprimida por fármacos. Esta visión provenía de los estudios “in vitro” de cultivos mixtos de células en modelos murinos / humanos en los que se observó poca proliferación de los linfocitos respondedores en presencia de células presentadoras de antígenos (APC) autólogas (mecanismo indirecto de presentación antigénica), y también por la inmediatez de una vigorosa respuesta humoral “in vivo” que solo permitía una breve supervivencia de los modelos discordantes<sup>4</sup>. Ahora sabemos que tal debilidad no existe, y antes de comentarlo describiremos los elementos que participan.

- Los Macrófagos: Son células representativas de la línea monocítica macrofágica, altamente fagocíticas, pertenecientes a la respuesta inmune inespecífica, que además producen y liberan un número de citocinas pro-

inflamatorias importantes (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12,  $\text{INF}\alpha$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , FT), estas características son claves para los procesos de presentación antigénica y de inflamación. Los macrófagos, como el sistema de complemento son elementos de enlaces entre respuestas innatas y adaptativas. Estas células conjuntamente con algunos polimorfonucleares aparecen en algunas formas de RXHA uniéndose a membranas previamente marcadas por C3b, C3bi, C4b o por Acs. Sin embargo, se han descrito interacciones primarias de lectinas de macrófagos con los azúcares de los endotelios porcinos que pueden activarlos e iniciar la coagulación a través de la elaboración de FT<sup>47</sup>.

- Los Neutrófilos: Son fagocitos profesionales de respuesta aguda. Se piensa que aparecen en el sitio de la inflamación atraídos por mediadores quimiotácticos, y al igual que los macrófagos pueden actuar primaria e independientemente de la presencia de xenoanticuerpos, complemento u otros factores del plasma<sup>48</sup>.
- Las Células “asesinas naturales” (NK): Son células altamente citotóxicas con dos mecanismos de destrucción: uno mediado por perforinas y otro que funciona mediante la unión al ligando FAS que induce apoptosis en células con expresión de receptores FAS. Normalmente las células NK son inhibidas en su función por la expresión de receptores inhibidores de la citotoxicidad que se unen a determinados haplotipos de moléculas de histocompatibilidad (MHC). Además de su función citotóxica natural, las NK pueden combinar su acción con elementos de la respuesta humoral por el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de Acs (ADCC) y por la liberación de las citoquinas que producen ( $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , e ILs). Estas células son altamente citotóxicas contra las células xenogénicas<sup>49,50</sup> y constituyen una barrera fundamental en trasplantes de medula ósea por su capacidad de reconocer blastos y células hematopoyéticas<sup>51</sup>. Recientes estudios sugieren que tienen una capacidad adicional para promover la presentación antigénica<sup>52</sup>. Tres factores pueden promover la acción de NK en xenotrasplantes: a) fallos de compatibilidad en MHC xenogénicos para inducir la señal de inhibición, b) estimulación de



receptores Fc II en NK por IgG xenoreactiva unida a células, y c) estimulación de sus receptores de activación tipo lectinas por los azúcares de las células xenogénicas<sup>21</sup>.

- Las Plaquetas: Las plaquetas humanas normalmente no reaccionan contra células porcinas, sin embargo cuando están estimuladas por pequeñas cantidades de trombina o atraídas en presencia del factor Von Willebrand de la coagulación pueden promover la liberación de FT, Selectina-E, IL-1 y otros productos del endotelio activado por unión del CD154 con el CD40 endotelial<sup>53</sup>.
- Los Linfocitos T: La respuesta inmune adaptativa es la forma de respuesta inmunológica con mayor nivel de especialización y elaboración de sus recursos. Aparece normalmente después de que algunos elementos de la respuesta innata se han desplegado en medida variable, y la mayor parte de las veces en perfecta armonía con esta porque los modos de activación de la respuesta adaptativa están originalmente en los fenómenos y los elementos representados en la respuesta innata. Los linfocitos T son los elementos centrales de la respuesta inmunológica adaptativa y su activación conlleva la elaboración de mecanismos efectores, su expansión clonal, la generación de la memoria inmunológica y la regulación de la propia respuesta.
- Se sabe que la secuencia de activación para la respuesta T comienza por la presentación de los antígenos a los linfocitos T por las APC, una fase de reconocimiento específico mediado por el receptor de las células T (TCR) y restringida por la homología genética que aporta el MHC de las APC. Además de esta interacción se necesitan otras señales coestimulatorias, integradas por correceptores y citocinas liberadas al medio. Si estos eventos se desarrollan plenamente comienza la expansión clonal y la respuesta adaptativa tiene lugar<sup>54</sup>.



En trasplante, los modelos de activación T se caracterizan por tener dos modos de reconocimiento antigénico<sup>55</sup>:

- a) El modo directo: cuando el péptido y el MHC del donante son presentados directamente al TCR del receptor, siendo aquí posible incluso el reconocimiento aislado de las regiones marco del MHC. Esto sucede fácilmente durante el alotrasplante por la alta frecuencia de precursores T respondedores.
- b) El modo indirecto: cuando los antígenos del órgano donado son procesados por las APC del receptor y presentados al TCR del receptor de forma MHC totalmente compatible, esta presentación es mediada por MHC clase II como sucede habitualmente con la mayor parte de los antígenos presentados durante cualquier respuesta inmune fuera de los modelos de trasplante. Los precursores T respondedores son menos numerosos en este caso.

En xenotrasplante la funcionalidad de ambas vías depende del modelo que se escoja. Por ejemplo, en el modelo humano / murino funciona la vía indirecta y no la vía directa<sup>56</sup>. La poca participación de la vía de reconocimiento directa en este modelo puede estar relacionada con la gran distancia biológica entre el MHC y el TCR de ambas especies, ello ocasiona la disminución en la avidéz del complejo y la reducción en la cantidad de células que participan en el reconocimiento. Por otro lado hay ausencia de señales de coestimulo<sup>23</sup> incompatibilidad de citocinas y células T de diferentes orígenes<sup>57</sup>. Sin embargo, en el modelo cerdo / primate, entre los linfocitos del huésped existe una parte que son capaces de reconocer directamente con especificidad para las moléculas MHC en el órgano porcino y además algunas señales coestimulatorias aportadas por APC son eficaces, es decir hay participación de reconocimiento directo.

El endotelio porcino es sumamente inmunogénico además porque: a) expresa MHC II constitutivamente en muchas paredes vasculares<sup>58,59</sup>, b) expresa

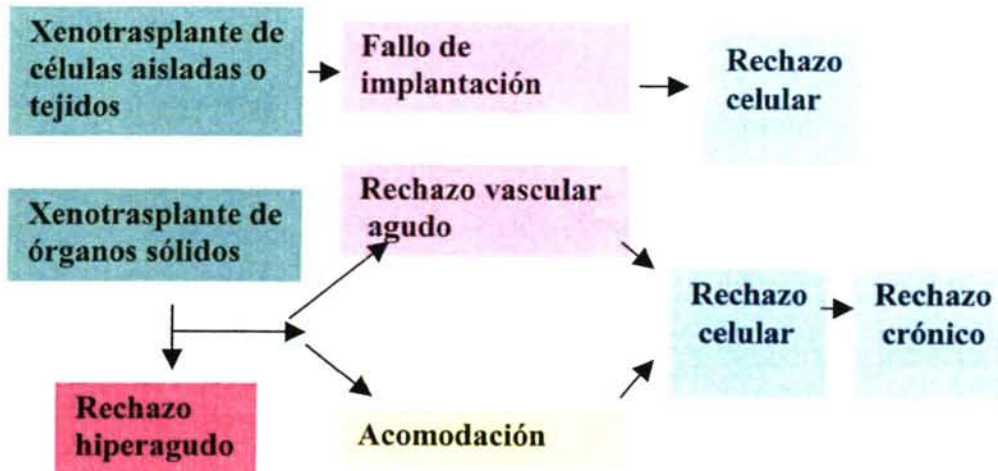
constitutivamente B7<sup>60</sup>, c) expresa MHC I con capacidad para presentar péptidos a linfocitos CD8 humanos (habilidad que parece faltar en APC de cerdos como se ha visto en experimentos que usan PBL o células dendríticas a pesar de la alta expresión de MHC I)<sup>61-63</sup>.

Pero además de esta respuesta directa hay una respuesta indirecta importante que es el resultado de la alta frecuencia de precursores T restringidos por MHC II contra una enorme variedad de péptidos procesados por las APC autólogas<sup>63</sup>.

Todo estos hechos en conjunto sugieren la posibilidad de una intensa respuesta celular desencadenada a partir de la participación de las células T en el modelo cerdo / primate y en especial en el humano.

### **2.3. Organización de la respuesta inmune.**

Un determinante fundamental en la organización de toda respuesta inmunitaria es la forma o vía de inmunización. La respuesta al xenotrasplante esta enormemente condicionada por la manera en que las células ajenas se ponen en contacto con la barrera inmunológica del receptor<sup>64</sup>. En el siguiente esquema se propone un posible orden de respuesta.



El xenotrasplante de células aisladas favorece la presentación de una respuesta celular y parece poco afectado por la respuesta humoral al contrario de lo que sucede en el xenotrasplante de órganos sólidos<sup>65</sup>. No se conocen las razones para que esto ocurra, quizás un elemento a tener en cuenta sea la necesidad de implantación en el receptor de las células aisladas bajo el nuevo ambiente. La limitación en la compatibilidad de factores de crecimiento y de angiogenesis puede conllevar al fallo del trasplante<sup>10</sup>.

Para el xenotrasplante de órganos sólidos la puerta de entrada de los mediadores de la respuesta inmune está canalizada directamente por la vascularización hacia el endotelio. En el modelo cerdo / primate el rechazo hiperagudo por activación de la vía clásica del complemento es iniciado por los Acs naturales, si la respuesta no se ha manipulado previamente inhibiendo alguno de los dos elementos<sup>41</sup>, de tal manera, que la presencia de neutrófilos, macrófagos, NK u otros elementos celulares, interaccionando primariamente con las células endoteliales, no son suficientes para desatar el rechazo hiperagudo en ausencia de complemento<sup>20</sup>. El depósito de componentes del MAC en la membrana endotelial se acompaña de la activación endotelial tipo I de sus células, aún antes de su destrucción. Los cambios que se observan son: la separación entre las células que permite la extravasación de líquido y los hematíes, la pérdida de sulfato de heparán por el endotelio que da lugar a cambios



pro-coagulantes en su superficie, y al final todo ello conlleva el edema, la hemorragia y la trombosis típicas del rechazo hiperagudo<sup>66</sup>.

Cuando se evita el rechazo hiperagudo, en un tiempo relativamente corto, se produce el RXHA cuyo mecanismo patológico es la activación tipo II del endotelio que ocurre más lentamente lo que permite la síntesis de nuevas moléculas, como ICAM-1, Selectina-E e IL-1s y FT, todas con carácter pro-inflamatorio. Ello favorece un ambiente pro-coagulante donde aparece la inflamación, la presencia de algún infiltrado inflamatorio, la trombosis y la fibrina como ya se explicó en la caracterización del RXHA<sup>67,68</sup>.

Existe cierta controversia acerca de los factores que desencadenan la activación del endotelio y disparan el RXHA. En varios modelos se ha propuesto a los macrófagos, neutrófilos y las NK<sup>47</sup>, pero en el modelo cerdo / primate hay dos hechos que cuestionan la importancia de estas células como factores de iniciación en este tipo de rechazo<sup>69</sup>: su aparición tardía y la poca inhibición de la respuesta por Acs monoclonales dirigidos a neutralizar a estas células.

Por el contrario en dicho modelo existe bastante consenso en la idea de que los Acs xenoreactivos sean los principales iniciadores del RXHA. Esta idea se confirma porque la depleción de Acs anti- $\alpha$ Gal es suficiente para retrasar el rechazo manteniendo intacta la función del complemento, la cascada de la coagulación y los elementos celulares<sup>70</sup>, no se descarta la participación de otros Acs<sup>21</sup> en este fenómeno. La forma cómo los xenoanticuerpos inducen este estado de activación, no está muy claro. Los Acs anti- $\alpha$ Gal se unen directamente a integrinas y alteran la función del endotelio, producen una regulación positiva para la transcripción del DNA del inhibidor tisular de metaloproteinasa1 (TIMP-1) y de la metaloproteinasa ADAM 10<sup>71</sup>. También se puede inducir la reacción por la producción de IL-1 $\alpha$  que activa pequeñas cantidades terminales del complemento<sup>72</sup> y de manera autocrina al FT, al inhibidor del plasminogeno Tipo 1 y a otros proinflamatoiros<sup>73</sup>.

La interacción de los Acs xenoreactivos con el endotelio no conduce invariablemente a la destrucción de los tejidos, ya que en varios modelos incluyendo el de cerdo / babuino<sup>74</sup> se ha observado acomodación. El origen de este estado se asocia a la aparición de proteínas anti-apoptóticas A20, bcl-2 y bcl-xl que bloquean la activación de NF-kapa  $\beta$  y en algunos casos previenen la apoptosis. Estos genes no están activados en las células endoteliales o del músculo liso de órganos rechazados, en los cuales sin embargo, hay Bad, Bax y CPP 32. Además, los órganos acomodados presentan un infiltrado mononuclear denso con células T cooperadoras tipo 2 (Th2) y altos títulos de IgG2c (Ig que fija poco complemento). La presencia de Th2 puede derivarse del efecto del NO generado también en el proceso<sup>75,76</sup>.

Si el rechazo hiperagudo y el RXHA se previenen, los órganos trasplantados pueden ser afectados por el rechazo celular. Ya se comentó las distintas formas de activación de las vías celulares en dependencia de los modelos en cuestión, en especial para las células T en el modelo cerdo / primate considerando además la inmunogenicidad de los endotelios porcinos. Definir la participación de las distintas subpoblaciones celulares y el tipo de mecanismos efectores que suceden es mucho más complejo porque la posibilidad de llegar a este estadio obliga casi siempre al uso de tratamientos inmunosupresores que influyen notablemente sobre la organización de la respuesta. Los modelos concordantes de roedores han indicado consistentemente que los CD4 son necesarios para el rechazo de piel e islotes de páncreas y son suficientes en ausencia de los CD8, las NK o las células B<sup>77,78</sup>. Estudios similares apuntan a la participación de Th2 de acuerdo al patrón de citocinas producidas, pero el uso aislado de las mismas en ratones knock-out no aclaran si alguna es esencial para el rechazo<sup>79</sup>.

La respuesta celular xenogénica en modelos “in vitro” cerdo / humano guardan cierta semejanza a la respuesta obtenida en modelos alogénicos pero es más fuerte y está caracterizada por los siguientes hechos<sup>4</sup>:

- Gran habilidad de las células NK en ocasionar la lisis de las células porcinas, en especial cuando son activadas con IL-2.



- Los linfocitos CD4 generan respuesta citotóxica y proliferativa frente a las células porcinas MHC II por las vías indirecta y directa de presentación.
- Los linfocitos CD8 generan citotoxicidad frente a las células porcinas MHC I, pero con menor producción de IL-2 cuando son estimuladas con células MHC I xenogénicas que cuando lo hacen con alogénicas.
- Las interacciones entre las moléculas de las dos especies (CD4 / MHCII), (CD8 / MHCI), (CD2 / LFA3), (CD28 / B7), (LFA1 / ICAM), (VLA-4 / VCAM), (FAS / FASL), son funcionales.

### 3. Prevención del rechazo xenogénico

#### 3.1. Depleción de Acs.

Con el objetivo de eliminar los Acs presentes en el organismo receptor se han seguido diferentes estrategias:

- Perfusión de órganos: Los primeros intentos para eliminar los xenoanticuerpos consistieron en la perfusión de plasma o sangre del receptor en órganos de cerdos donante, tales como hígados o riñones, mediante lo cual los Acs quedaban absorbidos por las células de los tejidos ajenos<sup>80,81</sup>. Con este procedimiento los mejores resultados demostraron que se lograba prolongar entre 5 días<sup>82,83</sup> a 15 días<sup>84</sup> la supervivencia de los trasplantes de pulmón, hígado y por último el riñón, en orden decreciente.
- Plasmaféresis: Este procedimiento está avalado por su uso clínico en enfermedades como crioglobulinemias, Miastenia Gravis, etc, donde parte de los Acs del plasma son eliminados. En el modelo de trasplante renal de cerdo / babuino la técnica ha sido relativamente útil pues ha eliminado los Acs anti- $\alpha$ Gal y prolongado la funcionalidad del órgano hasta 22 días en los que aparece el RXHA. Tanto en éste método como en el anterior se han señalado importantes limitaciones para su aplicación como<sup>85</sup>: la disminución transitoria



de los Acs, el incremento del riesgo de infección debido a la agammaglobulinemia y la manipulación, el consumo de factores de coagulación, el aumento de los costos derivados de la necesidad de repetir los ciclos de plasmaféresis y el empleo de varios órganos para la perfusión.

- Absorción de Acs: Este procedimiento se ha realizado de dos formas: a) utilizando columnas con matrices de proteína A o proteína G conocidas por su alta capacidad de unirse inespecíficamente a regiones Fc de los Acs, con las que se han obtenido modestos resultados<sup>86</sup> por la predisposición a las complicaciones infecciosas derivadas de la agammaglobulinemia. o b) la utilización de matrices con oligosacaridos dirigidos a eliminar específicamente Acs anti- $\alpha$ Gal. La eliminación de Acs anti- $\alpha$ Gal reduce la citotoxicidad humoral sin producir hipogammaglobulinemia<sup>87</sup>. La eficacia para disminuir los niveles de Acs mejora cuando se mantienen las absorciones por más de 24 horas probablemente por la redistribución de los Acs del espacio intravascular al extravascular<sup>88</sup>, no obstante la reaparición de Acs es posible y normalmente se controla con ayuda de otros métodos<sup>87</sup>.

### 3.2. Neutralización y supresión de la producción de xenoantiuerpos.

- Infusión de oligosacaridos: Otra opción para disminuir las reacciones de citotoxicidad mediada por los Acs es bloquear su acción neutralizándolos. Se han utilizado oligosacaridos sintéticos que se unen específicamente a residuos  $\alpha$ Gal y parecen ofrecer mejores resultados cuando se utilizan dosis altas y mantenidas<sup>88,89</sup>
- Infusión de Igs endovenosa: El uso de los concentrados de Igs endovenosas han sido eficaces en algunas enfermedades autoinmunes como la púrpura trombocitopénica idiopática o en alotrasplante<sup>90</sup>. En xenotrasplante, se ha demostrado la utilidad de este tratamiento para prevenir el rechazo hiperagudo, y produce un aumento del quimerismo hematopoyético en tratamientos con

depleción de Acs anti- $\alpha$ Gal. Los mecanismos por los que actúan las Igs endovenosas no están completamente claros, pero parece que se acelera el catabolismo de las Igs incluyendo las anti- $\alpha$ Gal, se inducen Acs idiotipos, y/o se inhibe la función de macrófagos<sup>87</sup>.

- Acs anti-idiotipos: La antigenicidad de una molécula de Igs dentro del mismo individuo depende de su región idiotípica que es el sitio por donde los Acs se unen a los antígenos. Esta región idiotípica puede inducir la producción de Acs que se conocen como Acs anti-idiotipos. Una subpoblación de los Acs anti-idiotipos, los que son complementarios a las regiones de reconocimiento de sus Acs inductores, se asemejan estructuralmente a los antígenos primarios. Por ello la administración de los Acs anti-idiotipos dirigidos a Acs anti- $\alpha$ Gal simula la administración de oligosacaridos. Cuando se suministran Acs anti-idiotipos de esta especificidad, estos se combinan con los Acs anti- $\alpha$ Gal y con sus linfocitos B, neutralizándolos y reduciendo la citotoxicidad en modelos cerdo / babuinos hasta el 10 %<sup>87,91</sup>.
- Anticuerpos dirigidos a linfocitos B: Varios Acs monoclonales dirigidos contra antígenos de diferenciación en células B diseñados para bioterapia en oncología se han usado en modelos xenogénicos. Dos de ellos un anti-CD20 no conjugado y un anti-CD22 conjugado con toxinas (ricina A o saporina) han demostrado que pueden abolir durante semanas la producción de Acs y mantener un nivel relativamente bajo de Acs anti- $\alpha$ Gal. Sin embargo la gran depresión que produce sobre las células B a expensas de una modesta influencia sobre los Acs anti- $\alpha$ Gal y la producción de una respuesta anti-anticuerpos, han limitado sus expectativas más allá de lo esperable<sup>87</sup>.

La producción de xenoanticuerpos se puede neutralizar también por otros métodos como la esplenectomía, la irradiación de células u órganos hematopoyéticos y por agentes farmacológicos, estos procedimientos no solo eliminan Acs sino que tienen acciones mas generales que se comentarán más adelante.



### 3.3. Administración de sustancias que inhiben el complemento

- Factor de veneno de cobra: Fue una de las primeras estrategias llevadas a cabo para eliminar la acción del complemento, su presencia origina un agotamiento del sistema por sobre consumo, sin embargo, el uso de esta sustancia induce una respuesta inmune que limita su actuación a un periodo de acción muy corto<sup>92</sup>.
- Los reguladores del complemento: Constituyen una familia de moléculas que controlan de forma natural al complemento “in vivo”, pudiendo actuar sobre las fases soluble de activación en el sistema del complemento (factor H, proteína enlazante de C4, factor inhibidor de C1, carboxipeptidasas N) o como moléculas ancladas a membranas (CR1, DAF, MCP, CD59). Algunas de estas proteínas ancladas a membranas se obtienen de forma soluble por modificaciones genéticas eliminando los extremos transmembranas e intracitoplasmáticos de su estructura.

a) Inhibidor del C1: Es una proteína natural del plasma perteneciente a la familia de inhibidores de las serina-proteasas capaz de inhibir C1s y C1r además de los factores XIIa, la Kalikreina y el XIa del sistema de coagulación. Este inhibidor se une a los sitios activos de las enzimas activas formando un complejo estable que es eliminado de la circulación tras unirse a los receptores específicos de los hepatocitos. Su empleo en modelos “ex vivo” cerdo / humano disminuye el rechazo hiperagudo<sup>93</sup>.

b) CR1 soluble: Fue el primer inhibidor del complemento que se obtuvo de forma recombinante y ha demostrado que puede prevenir el rechazo hiperagudo en modelos renales cerdos / babuinos<sup>95</sup>. Destaca entre las proteínas reguladoras de membrana porque inhibe las convertasas C3 y la C5 y es cofactor en la inhibición del C3b y del C4b. Las concentraciones requeridas para inhibir la lisis por la vía clásica son 100 veces menores que las requeridas por los factores H y C4BP (causan disociación de las



subunidades de la C3 y C5 convertasas). Una de sus limitaciones se relaciona con su escasa vida media (8 horas) en el humano. Recientemente, una nueva modificación que añade glicosilaciones con grupos siálicos Lewis X a la molécula, le aporta un carácter bifuncional permitiendo inactivar el complemento e inhibir a la vez los procesos de adhesión mediados por selectinas<sup>94</sup>.

c) Aunque DAF, MCP y CD59 se han obtenido de forma soluble, su uso en xenotrasplante está mejor documentado como moléculas ancladas a membrana, se revisarán dentro de los procedimientos que emplean órganos donantes modificados genéticamente.

- Acs monoclonales: La ausencia de un inhibidor específico para el C5 se ha tratado de resolver aprovechando la especificidad de los Acs monoclonales. Teniendo en cuenta que la activación del C5 es el primer evento para la formación del MAC, el bloqueo a ese nivel debería inhibir la cascada final del complemento dejando libre los primeros pasos en los que la opsonización y otras funciones inmunes se conservan. Este hecho supera una limitación para los procedimientos anteriormente señalados, la de la generación de cierto grado de inmunodeficiencia con el bloqueo total del complemento. El uso de Acs monoclonales contra C5 previene el daño agudo producido por el complemento en los modelos cardiaco cerdo / humano “ex vivo”<sup>96</sup>. Otros elementos como el C3 también ha sido diana para la generación de Acs pero sus resultados son menos interesantes. El tratamiento con Acs monoclonales tiene el problema de la inducción de una respuesta antagónica por su carácter antigénico a pesar de las distintas humanizaciones y manipulaciones genéticas realizadas<sup>94</sup>.
- Pequeñas moléculas inhibidoras sintéticas: Existen una gran cantidad de sustancias de diverso origen y características que pueden tener efectos sobre el complemento. A diferencia de los compuestos naturales o biológicos ya comentados, estas moléculas tienen en común una mayor simplicidad estructural que les permite algunas ventajas farmacocinéticas como la mejor

penetración en los tejidos, la mejor adaptación a formulaciones incluyendo las orales y el menor costo de producción. A continuación se mencionan algunos de los más relevantes. (Revisado por Sahu y Lambris<sup>94</sup>).

- a) El ácido monocarboxílico K-76 es un metabolito derivado del hongo *Stachybotrys complementi* que inhibe las dos vías de activación actuando a nivel del C5 y del factor I, aunque “in vitro” ha tenido buenos resultados, en modelos discordantes de xenotrasplante no logra aumentar la supervivencia.
- b) El Compstatin es un inhibidor de C3 nativo que impide su escisión por la convertasa de C3. Es específico del hombre y algunos monos pero no actúa sobre el complemento del cerdo, conejo, y roedores. En el modelo de perfusión renal porcino/ humano “ex vivo” ha prolongado la supervivencia.
- c) El FUT-175 o Nafamostat es un inhibidor de proteáceas de serinas que inhibe C1s, factor D, y las convertasas de C3 y C5 por lo que ha obtenido buenos resultados en varios modelos de animales para diferentes usos. Se ha usado conjuntamente con el K76 en modelos discordante de xenotrasplante.
- d) El BCX 1470 inhibe al factor D, C1s, trombina, factor Xa, y la tripsina. Está actualmente en fase de ensayo clínico II, aunque se ha descrito que es 180 veces más potente que el FUT 175 no se observa su aplicación en el xenotrasplante.

### **3.4. Órganos donantes modificados genéticamente.**

El objetivo fundamental de las modificaciones (básicamente en los cerdos) que se intentan en los modelos xenogénicos es la disminución de la reactividad inmunológica de los endotelios trasplantados. En este sentido se han abordado principalmente dos estrategias, la disminución de la antigenicidad de las células eliminando la expresión de antígenos  $\alpha$ Gal o el aumento de su resistencia a la acción del complemento incorporando moléculas con capacidad de inhibición sobre el mismo.



- Disminución en la expresión de  $\alpha$ Gal: La generación de animales en los que faltan o están disminuidos estos antígenos se ha intentado por diversas vías:
  - a) Por la inactivación del gen de la  $\alpha$ 1,3 galactosil transferasa que codifica la enzima catalizadora de la síntesis de la molécula Gal  $\alpha$  (1,3) Gal; pero esta tecnología para el cerdo no ha estado disponible hasta recientemente y las experiencias publicadas se limitan al ratón. Los órganos de ratones delecionados para el gen de la  $\alpha$  galactosil transferasa son bien aceptados por las cepas de ratones no modificadas, aunque es un resultado alentador hay que señalar que las condiciones en que se producen los ensayos representan mas bien las de un alotrasplante en las que se eliminan algunos obstáculos inherentes a las condiciones del xenotrasplante.

La producción de los cerdos clonados a partir de células somáticas permite la posibilidad de que por recombinación homóloga y transferencia nuclear se generen células delecionada para este gen y a partir de ella obtener cerdos clonados deficitarios de  $\alpha$ Gal<sup>2</sup>.
  - b) Alternativamente se ha propuesto disminuir la formación de antígenos  $\alpha$ Gal utilizando, de forma competitiva, la expresión de  $\alpha$ 1,2 fucosil transferasa, que cataliza la formación de azúcares no inmunogénicos para el humano<sup>97</sup>. En los modelos “in vitro” se ha logrado que líneas celulares expresando las dos enzimas disminuyan la producción de epitopes  $\alpha$ Gal a niveles insignificantes, pero “in vivo” no se logra una expresión adecuada de los transgenes<sup>98</sup>.
  - c) Otra interesante estrategia de reducción de  $\alpha$ Gal es la obtenida con la expresión de un fragmento de Ac recombinante de una única cadena variable (ScFv), dirigido a la enzima  $\alpha$ 1,3 galactosil transferasa de células de cerdo. La expresión de este sistema redujo los niveles antigénicos en un 70% y de citotoxicidad en el 90%<sup>99</sup> en experimentos “in vitro” con células cultivadas.



- Expresión transgénica de moléculas reguladoras del complemento MCP, DAF y CD59: Se han realizado numerosos ensayos “in vitro” e “in vivo” con distintos órganos o tejidos de cerdos transgénicos que expresan en su superficie las moléculas humanas reguladoras del complemento MCP, DAF, CD59 o combinaciones ellas. Todos los resultados indican la disminución de la respuesta de rechazo<sup>1,2,4,100</sup>. El uso de órganos de los animales que expresan DAF solamente o los animales doble transgénicos DAF/CD59 parece ser suficiente para evitar el rechazo hiperagudo aún cuando los niveles de expresión de estas moléculas en los tejidos porcinos son significativamente menores que en el humano<sup>101</sup>. Sin embargo, la prolongación de la supervivencia obtenida en xenotrasplantes cardíacos heterotópicos cerdo transgénico / primate se ha visto reducida en modelos ortotópicos similares de 2 meses a 9 días, lo que indica que la mejoría de la supervivencia no es todavía suficiente y hay que considerar otros factores cuando se trata de modelos de soporte vital<sup>94</sup>. Por otra parte, la restricción de especie existente entre las moléculas reguladoras del complemento es el sentido fundamental de estos transgenes y sin embargo, hay trabajos que no encuentran correspondencia entre la compatibilidad lograda en el transgén y la eficacia en la inhibición total del rechazo por lo que sugieren otros mecanismos<sup>102</sup>. En algunos trabajos el papel protector de los órganos transgénicos previniendo eficientemente el rechazo hiperagudo se vuelve controvertido cuando se intenta evitar el RHXA, donde la participación del complemento es menor<sup>2</sup>.

### 3.5. Inducción de tolerancia al xenotrasplante.

Una de las desventajas de los tratamientos que tratan de abolir la respuesta frente al injerto en alotrasplante es la inducción de estados de inmunodeficiencias que aumentan considerablemente el riesgo de infección y de neoplasias. Esto cobra mayor valor en el xenotrasplante si se piensa que las dosis necesarias para inmunosuprimir las respuestas de rechazo podrían ser superiores a las usadas en el alotrasplante. Además, el xenotrasplante brinda la oportunidad de modificar las respuestas inmunitarias

mediante manipulación de los antígenos del donante previo al trasplante. Las aproximaciones realizadas en los alotrasplantes, aplicando conceptos de anergia, delección e inmunosupresión para la inducción de la tolerancia, se han tratado de llevar a los modelos xenogénicos dando lugar a una amplia variedad de protocolos que se encuentran actualmente en fases de ensayos<sup>4</sup>.

La inducción de tolerancia mediante un estado de coexistencia entre las células del donante y del receptor recibe el nombre de quimerismo. Se pueden definir tres tipos de quimerismos según la relación de células donantes y receptoras: quimerismo total, macroquimerismo mixto y microquimerismo<sup>103</sup>. Estos procedimientos logran largos periodos de tolerancia inmunológica de varios órganos en alotrasplantes de especies concordantes (roedores, monos) manteniendo a veces una mínima cantidad de células del donante. Se han comunicado casos de microquimerismos en humanos con fallo renal y neoplasia hematológicas, que han recibido trasplante renal y de médula ósea sin régimen mieloablativo previo, e incluso algunos de ellos han quedado sin medicación específica días después del trasplante y con funciones correctas de los órganos trasplantados<sup>103</sup>.

Para el establecimiento del quimerismo mediante el trasplante de médula ósea, precursores hematopoyéticos u otras fuentes, se requiere el acondicionamiento previo del receptor por métodos de irradiación, tratamiento farmacológico, esplenectomía, timectomía, depleción de linfocitos por Acs monoclonales u otros métodos que faciliten la implantación de las células del donante en el receptor. En los modelos de xenotrasplante existe una complicación añadida por la presencia de xenoanticuerpos que limitan el éxito del implante y aumentan los problemas de los tratamientos destinados a evitar el rechazo hiperagudo. En este sentido, los modelos deleccionados de antígenos  $\alpha$ Gal ofrecen mayor ventaja para obtener animales quiméricos. Usando modelos de ratones y ratas que no expresan antígenos  $\alpha$ Gal a los que se trasplantan con medula ósea mixta ó transfectada por vectores virales con  $\alpha$ Gal previo al trasplante del órgano xenogénico, se demuestra que se convierten en animales tolerantes, sin producción de Acs anti- $\alpha$ Gal, lo que indica la inducción a la tolerancia



B y T creada bajo el nuevo ambiente<sup>104</sup>. Las dificultades para lograr estos modelos en primates no obstaculizan totalmente el desarrollo de modelos quiméricos que es en la actualidad un terreno muy activo dado su potencial como alternativa terapéutica. Otros procedimientos útiles para la inducción de tolerancia, que incluyen el uso de fármacos inmunosupresores y moléculas moduladoras de la respuesta inmune, se están teniendo en cuenta con el objetivo de lograr condiciones más favorables con riesgos y toxicidades menores.

### **3.6. Otros inmunosupresores.**

La eficacia de casi cualquier método de depleción, neutralización, o inactivación de Acs y complemento está seriamente afectada si no se acompaña de un tratamiento inmunosupresor farmacológico<sup>105</sup>. Actualmente existe una amplia gama de fármacos destinados a frenar la respuesta inmune y otros tantos en fases experimentales. Los mecanismos de acción y las dianas que utilizan difieren entre ellos y tienden a ser cada vez más selectiva. En protocolos de alotrasplantes se han usado varios Acs monoclonales dirigidos contra subpoblaciones celulares (CD3, CD4, CD8) o receptores implicados en procesos de activación de células inmunocompetentes (CD25, CD154, CD28, CD40), moléculas de fusión (inmunotoxinas, CTLA-4-Ig), etc. La descripción de los distintos ensayos y sus resultados es un tema extenso que puede ser consultado en Dambrin y Pleyer<sup>105,106</sup>. Con respecto al xenotrasplante no debe olvidarse que debido a la intensidad y al tipo de respuesta producida en los modelos de importancia clínica, el uso de muchas de estas sustancias ya utilizadas o en fase experimental, queda fuera de lugar, al menos mientras no sean resueltos otros problemas más acuciantes del xenotrasplante como el rechazo hiperagudo y el RXHA.

## **4. Evaluación de la citotoxicidad humoral.**

Los mecanismos de citotoxicidad humoral están presentes en casi cualquier respuesta inmunológica aguda, aunque sus efectores comprenden varios elementos solubles como citoquinas, enzimas etc, el sistema del complemento y los Acs, son dos de sus



elementos claves presentes en un gran número de mecanismos de daño humoral. Por ello es común referirse al efecto destructor de los Acs y del complemento como citotoxicidad humoral.

Dado que la citotoxicidad es una función del sistema inmune, el término implica que los Acs incluidos en un mecanismo de citotoxicidad (Acs citotóxicos) no sólo son capaces de unirse pasiva y específicamente a un antígeno o de promover otra función biológica como la opsonización, sino que deben producir un daño sobre la célula o estructura en la que reconocen a los antígenos. El complemento actúa por el reconocimiento previo de los Acs sobre los antígenos pero también puede lograr su activación independientemente de la presencia de Acs porque posee la vía alternativa de activación y otra inducida por lectinas<sup>107</sup>.

En el xenotrasplante, como ya hemos descrito, hay una participación importante del complemento y los Acs en las reacciones de rechazo, esto hace que los métodos de laboratorio para el estudio de la función citotóxica se hayan incorporado como instrumentos de investigación básica en el tema, y formen parte de las baterías de pruebas que se usan en los ensayos con xenotrasplantes.

#### **4.1 Métodos experimentales de evaluación citotóxica.**

Existen diversas técnicas de laboratorio para estudiar la respuesta humoral de forma funcional o no funcional. Por ejemplo, el complemento puede ser evaluado cuantificando los niveles de algún componente específico como C3, C4b, etc, de igual forma que los Acs de una especificidad definida pueden ser cuantificados por varias técnicas como los inmunoensayos enzimáticos, inmunofluorescencias etc. Todos estos ensayos aunque pueden ser útiles para algunos aspectos, aportan poco sobre la capacidad citotóxica de los Acs o acerca de la funcionalidad de las vías del complemento.

Para medir la capacidad lítica de la respuesta humoral las técnicas deben explorar la presencia de Acs citotóxicos o probar la funcionalidad del complemento. En el estudio del xenotrasplante ambas exploraciones tienen gran importancia porque, como hemos visto, el rechazo hiperagudo está mediado por la activación del complemento derivada de la presencia de Acs xenogénicos, y en cuanto al RXHA, si bien el complemento no parece el iniciador de la respuesta en buena parte de los estudios realizados, su participación no está totalmente descartada del transcurso de la misma. Otras razones para el empleo de los métodos de estudio del complemento o de los Acs citotóxicos tienen que ver con la caracterización funcional de los Acs participantes en el xenorechazo y con el seguimiento de los ensayos pre-clínicos, en los que ambas determinaciones deben ser útiles para establecer el diagnóstico en cada momento y las pautas terapéuticas.

Muchos de los estudios de citotoxicidad se basan en la medición de la viabilidad celular. Los primeros éxitos en la cuantificación de la acción funcional del complemento se basaron en la posibilidad para distinguir entre hematíes lisados e intactos midiendo la hemoglobina liberada por acción de muestras de sueros<sup>108</sup>. Este principio, relativamente fácil de aplicar en los ensayos hemolíticos, tuvo algunos contratiempos para extenderse a ensayos con células nucleadas debido a las dificultades para fijar el criterio de muerte<sup>109</sup>. Se han desarrollado varios métodos incluyendo el marcaje isotópico de las células dianas<sup>110,111</sup>, el uso de fluorocromos y técnicas de microscopía<sup>112-114</sup> y se han comparados las ventajas de cada uno<sup>109</sup>. La citometría de flujo presenta varias ventajas: permite el conteo diferencial de partículas en base a varios parámetros, elimina la subjetividad de los métodos de lectura visual (como la microscopía óptica) y realiza el análisis de combinaciones de colores o variables físicas de forma automatizada<sup>115</sup>. Para evaluar funciones citotóxicas en xenotrasplante se han aplicado de alguna forma tanto evaluaciones con marcaje isotópico, ensayos hemolíticos como estudios citométricos<sup>116-119</sup>.

A pesar de la diversidad de métodos funcionales en general, los ensayos hemolíticos son probablemente los que más se han utilizado en el estudio clínico de las funciones



del complemento, en particular “la actividad hemolítica del complemento 50%” (CH50) para la exploración de la vía clásica<sup>120,121</sup>. Los Acs citotóxicos pueden estudiarse también por una pequeña variación en la técnica del CH50<sup>116,117</sup>.

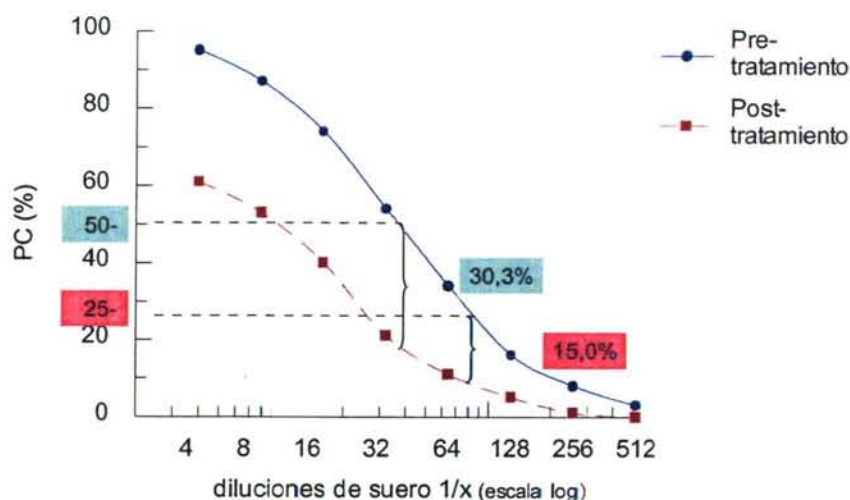
#### **4.2. La expresión de los resultados en estudios funcionales de citotoxicidad**

Cuando se realiza un ensayo CH50, ó alguno similar, se obtiene una curva de respuesta citotóxica en la que la representación de la capacidad lítica del suero está en función de sus diluciones, es decir, los pares numéricos son: las diluciones del suero, y los porcentajes de muerte celular correspondientes a cada dilución.

Cuando se quieren estudiar un número de muestras relativamente grande la representación gráfica de las curvas de citotoxicidad no es un método cómodo y las comparaciones entre grupos se hacen prácticamente imposibles. La solución a este problema es la utilización de una única medida (un número) que represente la información ofrecida en la curva. Para cumplir tal objetivo son posibles varias aproximaciones: a) Utilizar un punto arbitrario en representación de todos, b) realizar gráficos de todas las curvas y extraer visualmente un punto intermedio (usualmente el valor de la dilución que se corresponde con el 50%) o c) generar un modelo matemático que se ajuste a las curvas e interpolar sobre ese modelo el porcentaje escogido.

La elección de un punto cualquiera (primera aproximación) puede afectar el resultado del fenómeno de citotoxicidad, esto se trata de explicar mejor en el ejemplo siguiente (ver figura a continuación)





Se describen dos curvas de citotoxicidad, la primera sobre un suero no tratado, la segunda en un momento hipotético posterior a algún tratamiento de tipo supresor de la actividad citotóxica humoral. Si se eligen dos diluciones 1/35 (a la que le corresponde casi el 50% de la actividad citotóxica en el suero normal) y 1/85 (al que le corresponde casi el 25%) para examinar la diferencia observada con respecto a la muestra de suero inhibido, es decir, la disminución de la potencia del suero por efecto del tratamiento, son posibles dos resultados: el primero representa una disminución de la citotoxicidad de aproximadamente el 30% si el suero se evalúa en la dilución 1/35, el segundo una disminución del 15% si se hace en el punto 1/85. Ambos resultados difieren uno del otro en el doble de la cantidad lo cual pudiera ser importante en un caso particular.

La utilización de valores extraídos directamente de los gráficos es un método bueno, en tanto se observa el recorrido y la tendencia total en el gráfico del poder citotóxico de la muestra investigada, sin embargo sus desventajas radican en que la exactitud con que el ojo humano traza la curva y escoge el punto correspondiente a la interpolación deseada es totalmente subjetiva y además muy laboriosa.

Los métodos matemáticos para el ajuste de curvas y la estimación de puntos mediante éstas se conocen y manejan desde hace mucho tiempo. En particular, para el estudio de la citotoxicidad se propuso una ecuación a principios del siglo pasado<sup>122</sup> por Von

Krogh, mediante la cual se calcula el valor exacto de una dilución sérica tomando el 50% de hemólisis. Esta unidad hemolítica ha sido ampliamente difundida y es probablemente la medida más utilizada en los estudios funcionales del complemento<sup>120,121</sup>.

## **5. Justificación del estudio.**

La eliminación de cualquier forma de rechazo, en primer lugar de los rechazos hiperagudo y del RXHA es indispensable para iniciar el curso de los xenotrasplantes. La citotoxicidad humoral es el mecanismo de la respuesta inmune predominante del rechazo hiperagudo y juega un papel no esclarecido en RXHA, participando posiblemente de forma importante en la inducción a la activación II del endotelio<sup>21,70,72</sup>.

El seguimiento de los trasplantes durante los ensayos pre-clínicos realizados en animales, tiende lógicamente a incluir la exploración de los elementos centrales de la respuesta inmunológica con participación en el mecanismo de rechazo. De este modo, se ha recomendado la incorporación de pruebas inmunológicas para la evaluación y el mejor control de los animales durante el tratamiento<sup>123,124,126</sup>

La experiencia acumulada hasta el momento indica que la evaluación aislada de los Acs anti- $\alpha$ Gal, de los componentes del complemento, y de la medición de la función citotóxica u otros no es totalmente eficaz para el seguimiento de estos animales y todas ellas aisladamente parecen poco útiles en la predicción del RXHA<sup>123,124</sup>. Una posibilidad a analizar concierne a las pruebas funcionales y al espectro antigénico que los métodos consideran, la evaluación actual de la citotoxicidad se realiza siempre sobre un mismo tipo de célula diana, normalmente hematíes. La introducción de otros blancos celulares podría afectar el resultado de los ensayos, sobre todo si se tiene en cuenta que las técnicas que miden la unión de Acs anti-porcinos totales frente a cualquier molécula en membranas cobran valor sobre las específicas para las  $\alpha$ Gal<sup>124</sup>. La utilización de métodos más flexibles como la detección funcional de la



citotoxicidad por citometría de flujo parece apropiada para este propósito, pero en este caso, conlleva paralelamente algunos aspectos formales en la expresión de los resultados que no han sido abordados anteriormente y pueden contribuir a la precisión de los resultados.

El empleo de un método funcional que facilite la inclusión de los distintos blancos celulares, y que también permita la exploración por separado de los Acs citotóxicos y del complemento permite indagar en los mecanismos citotóxicos desde dos puntos de vista, a través del estudio funcional de varios Acs con especificidades distintas y en el papel efector del complemento mediando el daño celular.

Para comprender los mecanismos que intervienen en el rechazo se requiere detectar las especificidades más relevantes a las que algunos efectores de la respuesta inmune como los Acs dirigen sus acciones. La caracterización de tales dianas (por ejemplo los antígenos  $\alpha$ Gal) aunque necesaria no basta, ya que se debe determinar los efectos funcionales de los efectores inmunológicos sobre sus blancos y ambos aspectos pueden ser analizados con la ayuda de pruebas que miden Acs citotóxicos.

La evaluación funcional del complemento es importante para el análisis del papel protector de sus moléculas reguladoras. Por ejemplo hDAF se ha incluido por manipulación genética en los tejidos de cerdos transgénicos con la idea de inhibir la activación del mismo. La presencia de moléculas hDAF ha demostrado ser útiles para este fin<sup>2,94,100,125</sup> sin embargo, la protección de esta molécula para evitar el rechazo no es absoluta y se están comenzando a investigar los mecanismos que fallan<sup>102,126</sup>.

El estudio de la citotoxicidad humoral, es decir, de la función de Acs y complemento en la respuesta al xenoinjerto no esta agotado, requiere de nuevos métodos y diseños para su análisis. Este trabajo se encaminó a la aplicación de la citometría de flujo para, desde las ventajas del método, explorar la respuesta citotóxica del xenotrasplante “in vitro”.



## ***OBJETIVOS***

## **II. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General**

- Analizar la respuesta citotóxica humoral que interviene en el rechazo del xenotrasplante cerdo / primate.

### **2. Objetivos Específicos**

- Evaluar la aplicación de un método citométrico que permita el análisis funcional de los Acs citotóxicos, el complemento y el estudio flexible de diferentes dianas celulares.
- Determinar una forma adecuada para la expresión de los resultados obtenidos por el ensayo funcional citométrico.
- Explorar la participación en la respuesta xenogénica de otros Acs no medidos por ensayos hemolíticos clásicos.
- Caracterizar la clase, especificidad y potencial citotóxico de los Acs citotóxicos no hemolíticos contenidos en las muestras de los sueros de los animales receptores.
- Analizar el papel protector del transgen hDAF en la respuesta citotóxica sobre el modelo cerdo trasgénico /primate “in vitro”
- Evaluar si factores como la cantidad de xenoanticuerpos en los sueros, el nivel de expresión molecular en la superficie celular de hDAF o el grado de homología interespecie, influyen en la protección frente al rechazo cuando se utilizan los animales transgénicos.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1. Material biológico empleado.**

##### **1.1. Animales**

Todos los animales utilizados estaban incluidos en protocolos de trabajo del grupo de xenotrasplantes de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario “Juan Canalejo” en La Coruña. Los procedimientos llevados a cabo sobre los mismos siguieron el “Acuerdo Europeo de Protección de Animales Vertebrados para uso Experimental”(BOE 25/10/1990).

Cerdos: El cerdo X4 de raza Large White, con 8-10 meses de edad, y peso entre 130-150 kg se usó como control para la obtención de células y sueros normales, en la mayoría de los experimentos. También se emplearon otros 5 cerdos del mismo tipo, entre 2 - 5 meses y 10-40 Kg de peso, para la obtención de una mezcla de suero (SCN), según se mencionará oportunamente (Suministrados por Coren SL, España).

Cerdos Transgénicos: Se emplearon muestras de 9 cerdos de raza Large White entre 2-5 meses de edad y 5-25 kg de peso, que eran transgénicos para la expresión homocigótica del gen DAF humano (hDAF) (Novartis Pharma, Basilea, Suiza)

Babuinos: Se usaron muestras de 14 Papio Sp, de entre 4-25Kg de peso (procedentes de Kenia), en diferentes momentos del protocolo de xenotrasplante. También se preparó una mezcla de 6 sueros procedentes de animales en condiciones basales (SBN) previos a cualquier tratamiento para experimentos específicos.

##### **1.2. Muestras de sueros.**

Para la obtención de los sueros a partir de las muestras de sangre total de las diferentes especies animales mencionadas, la sangre se dejó coagular a temperatura ambiente

durante 40 minutos y se centrifugó a 800xg 4°C. Tras su separación el suero se mantuvo en frío hasta su uso inmediato o se repartió en alícuotas y se congeló a -80°C para su conservación. La inactivación del complemento en las muestras, solo en los experimentos que así lo requirieron, se realizó por calor a 56°C durante 30 minutos.

De igual forma se obtuvo una mezcla de diferentes sueros humanos normales (SHN) procedentes de la sangre periférica humana de más de 30 individuos adultos sanos, que se usó como control en la mayoría de los experimentos

### **1.3. Células aisladas de sangre total**

A partir de sangre heparinizada de los distintos animales se obtuvieron diferentes poblaciones celulares:

Células mononucleares periféricas (PBL): Se aislaron, a partir de la centrifugación de las muestras con un gradiente de densidad, según el método de Boyum<sup>127</sup>. Brevemente, la sangre era recogida en tubos heparinizados y diluida ½ en solución salina isotónica NaCl 0.9% estéril. Se depositaron 10 ml de sangre diluida sobre 5 ml de solución histopaque 1077 (Sigma, USA) con cuidado de no romper la interfase. Los tubos se centrifugaron a 800xg durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron los anillos de células mononucleares situados en la interfase de los líquidos, y se lavaron tres veces a 4°C, 300xg en HBSS (Gibco, UK.) Tras el último lavado, las células se contaron en un hemocitómetro y su viabilidad fue cuantificada por coloración con azul tripán.

Hematíes de cerdo para los estudios de citotoxicidad: Se prepararon según el procedimiento habitual seguido en el laboratorio<sup>117</sup>. A partir de la sangre total de un cerdo control (siempre el mismo, previamente seleccionado por sus valores adecuados de citotoxicidad frente al SHN), se obtuvieron concentrados limpios de hematíes tras centrifugación a 800xg y lavados sucesivos de las células con solución tampón para fijación de complemento (CFD), hasta obtener sobrenadantes totalmente claros.



Hematíes de cerdo para procedimientos de absorción de sueros: La sangre total del cerdo control se centrifugo a 800xg 10 minutos y a 4°C, se eliminó la capa superficial de células leucocitarias, se reconstituyó en igual volumen de solución salina isotónica NaCl 0,9% y se retiraron las células mononucleares por un gradiente de histopaque 1077, eliminándose el resto de células en sucesivos lavados. Hasta un total de cinco lavados se realizaron con la misma solución y condiciones de centrifugación iniciales. Posteriormente para determinar la proporción de células leucocitarias remanentes en los hematíes se evaluó una muestra de 5µl por conteo automático en el hemoanalizador MS9 (Francia).

#### **1.4. Líneas y cultivos celulares**

Las líneas porcinas de crecimiento continuo que se utilizaron en los experimentos que posteriormente se describirán son las siguientes:

PK15: Es una línea celular porcina de origen epitelial renal. Su cultivo se realizó en medio DMEN suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100 UI/ml de Penicilina, 100 µg/ml Streptomycin, y L Glutamina 2 mM. Las células se crecieron sobre frascos de cultivos gelatinizados (gelatina 1 mg/ml. Sigma, USA).

AOC40: Son células de origen endotelial derivadas de aorta porcinas. Su cultivo se realizó en similares condiciones a las células PK15 pero con adición de Geneticina 200 µg/ml porque la línea había sido transformada con un plásmido que contiene un gen de resistencia al antibiótico.

L35: Es una línea celular derivada de linfocitos T porcinos que crecieron en suspensión en medio RPMI 1680, SFB 10%, 100 UI/ml de Penicilina, 100 µg/ml Streptomycin.



Todas las células fueron mantenidas en frascos de cultivo 75cm<sup>3</sup> (BD Falcon.Francia), a 37°C y atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> hasta su uso en los distintos ensayos. Todos los reactivos utilizados en estos cultivos proceden de Gibco, UK.

## **2. Soluciones y Reactivos.**

Se mencionan aquí solo las que necesitaron elaboración en el laboratorio. Los comerciales usados directamente aparecen en cada procedimiento específico:

### **2.1. Empleados en citometrías:**

Diacetato de Fluoresceína. (Daf) (Sigma, USA). Solución para almacenamiento 1 mg/ml en acetona, mantenida a 4°C y protegida de la luz.

Ioduro de Propidio. (IP) (Sigma, USA). Solución para almacenamiento 50 µg/ml en HBSS, mantenida a 4°C y protegido de la luz.

### **2.2. Empleados en ensayos hemolíticos dependientes de complemento (EHC)**

Solución para la fijación de complemento (CFD) (ICN Biomedicals inc, USA). Se disolvió 1 tabletas en 100 ml de agua destilada y almacenó a 4°C.

### **2.3. Empleados en ensayos de electroforesis y Western Blot:**

#### Tampón Lisis (LS)

Tris Base	50 mM (ICN Biomedicals inc, USA)
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM (Sigma, USA)



Tween 20	1 %		
(PanReac, España)		<u>Gel Concentrador de proteínas</u>	
		Solución Acrilamida-bis	acrilamida
<u>Tampón de Bloqueo</u>		5%	
Tampón de lavado + BSA	1%	Tris –CLH pH 6,8	375 mM
(Sigma, USA)		SDS	0,1%
		Persulfato de amonio 10%	5 µl/ml
		TEMED	1 µl/ml

## 2.4. Usos varios.

Tampón Bicarbonato pH 9,6 almacenado a 4°C

NaHCO <sub>3</sub>	100 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	100 mM (Sigma, USA)

Tampón Fosfato (PBS).

NaCl	140 mM
KCl	2,7 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	300 mM (Sigma, USA.)

## 3. Procedimientos Generales.

### 3.1. Absorción de sueros de babuinos con hematíes porcinos.

Las condiciones óptimas para la absorción de las muestras de sueros humanos y de babuinos se establecieron probando diferentes condiciones de temperatura y número de ciclos de exposición de los sueros con los antígenos presentes en los hematíes. Éstas consistieron en mezclar 1,5 ml de suero inactivado con 0,5 ml de eritrocitos porcinos de cerdo normal, previamente separados y limpios. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora en rotación, se centrifugaron a 800xg durante 10



minutos, se recogió el sobrenadante y se mezcló de nuevo en 0,5 ml de eritrocitos. La mezcla de suero y eritrocitos se incubó a 4°C por 1 hora en rotación, y todo el procedimiento fue repetido una vez más.

En algunos casos fue necesario concentrar los sueros absorbidos para lo que se concentraron en tubos con membranas de filtración de poliétersulfona con poro 10 K nm (Millipore, USA). Se centrifugaron a 4°C a 3000xg durante 2 horas. De este modo se logró reducir el volumen original cinco veces.

### **3.2. Ensayos de citotoxicidad**

Se realizaron tres tipos de ensayos diferentes de acuerdo a sus mecanismos de funcionamiento:

- Un método para detectar Acs citotóxicos por citometría de flujo que permitió el estudio de complemento de forma independientemente o en combinación con los Acs
- Un ensayo para medir Acs hemolíticos<sup>117</sup>, y
- Una técnica que empleó la liberación del radioisótopo Cr<sup>51</sup> en la cuantificación de la muerte celular inducida por el complemento<sup>110</sup>.

#### **3.2.1. Ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento por citometría de flujo. (CCCF)**

Se emplearon dos formas o vías de este método: una que usó el complemento propio de las muestras de suero para llevar a cabo la lisis de las células dianas (vía endógena), y otra que emplea una fuente externa de complemento, en nuestro caso de conejo (vía exógena).

El esquema seguido fue el siguiente: las células dianas PBL, PK15, AOC40 ó L35, previamente lavadas y ajustadas a concentraciones entre 2,5-3,0x10<sup>5</sup> células por

pocillo, se incubaron con 60  $\mu$ l de sueros de babuinos o SHN, nativos o descomplementados según fuera el caso. Se realizaron diluciones dobles seriadas de las muestras con HBSS que se mantuvieron durante 30 minutos a 37°C en placas de 96 pocillos de fondo en v (Nunc, Dinamarca).

A partir de aquí el procedimiento continuó de forma diferente según el tipo de vía a analizar. Para la vía exógena fue necesaria la presencia de un paso intermedio en el que las células se lavaron tres veces y se les añadió 50  $\mu$ l de complemento de conejo (Serotec, UK) en HBSS, a la dilución previamente establecida según el lote, (generalmente 1/5) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. La vía endógena no requirió este paso.

Posteriormente (para ambas vías) las células se lavaron tres veces y se incubaron directamente con 20  $\mu$ l de Daf (0,002  $\mu$ g) y 10  $\mu$ l de IP (0,5  $\mu$ g) durante 15 minutos en la oscuridad. Se establecieron controles de células vivas o muertas de forma espontánea mediante incubación de células con sueros inactivos sin adicción de complemento, para determinar las condiciones de viabilidad en que se desarrollaron los experimentos. El efecto del complemento aislado sobre las células fue controlado además mediante pocillos sin la presencia de los sueros.

Finalmente, las células se transfirieron a tubos de citometría, y se analizaron en número de 5000 con un citómetro FACScan (Becton Dickinson, USA) a través del programa CellQuest de la misma marca. Se realizó un análisis bivariado de los eventos registrados en FL1 vs FL3 delimitándose 4 cuadrantes. Las células se consideraron: vivas si se teñían de verde en el cuadrante inferior derecho, muertas si lo hacían de rojo en el superior izquierdo, y dañadas, las situadas en el cuadrante superior derecho que eran doblemente positivas. Los conteos dobles negativos fueron excluidos en todos los casos.

Según el análisis de uno u otro cuadrante se determinaron dos porcentajes de citotoxicidad:



$PC_1 = (\text{porcentaje de células muertas en el experimento} - \text{porcentaje muerte espontánea}) / (100 - \text{porcentaje de muerte espontánea}) \times 100$ . Este porcentaje representa la citotoxicidad basándose en el marcaje con IP.

$PC_2 = (\text{porcentaje de células vivas controles} - \text{porcentaje de células que permanecen vivas bajo la acción de los sueros}) / (\text{porcentaje de células vivas controles})$ . Este porcentaje representa la citotoxicidad basándose en el marcaje Daf.

### **3.2.2. Ensayo hemolítico dependiente de complemento (EHC).**

Para la realización de este ensayo seguimos el protocolo previamente establecido por nuestro grupo<sup>117</sup>.

Sobre placas de 96 pocillos fondo en “v” se colocaron por cada pocillo 50 µl de una dilución seriada de las muestras de sueros con tampón CFD. A cada uno se le añadieron 50 µl de eritrocitos porcinos al 1% en CFD y se incubaron a 37°C durante 1 hora, se lavaron 3 veces a 400xg durante 10 minutos en igual tampón y se añadió a cada pocillo 150 µl de complemento de conejo a la dilución óptima (generalmente 1/20) incubándose nuevamente a 37°C por 1 hora. Posteriormente las células se sedimentaron mediante una centrifugación y se recogieron 100 µl de los sobrenadantes con distintos grados de hemólisis que se transfirieron a una placa fondo plano (BD Falcon, Francia) para su lectura a la longitud de onda 420 nm densidad óptica (DO) en un lector (Multiscasn Plus, Alemania). Paralelamente, se procesaron un grupo de pocillos controles consistentes en: Eritrocitos incubados con complemento sin la presencia de sueros, células en presencia de sueros sin complemento para la observación de la hemólisis espontánea y un control de lisis máxima constituido por los eritrocitos destruidos por 100 µl de agua destilada.

Los porcentajes específicos para cada dilución fueron calculados de forma similar al método anterior:



PC= (DO en cada dilución muestra – DO lisis espontánea) / (DO lisis máxima - DO lisis espontánea) x 100

### 3.2.3. Ensayo de citotoxicidad por liberación de Cr<sup>51</sup>

En estos experimentos se emplearon como dianas células PK15 previamente lavadas y marcadas con 50  $\mu$ ci de cromato<sup>51</sup> de sodio (Amershan, UK) por cada 10<sup>6</sup> células, incubándose a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, las células se lavaron cuatro veces en solución HBSS centrifugándose a 300xG durante 7 minutos, se dejaron reposar 30 minutos a 4°C y se lavaron nuevamente para eliminar cualquier resto del isótopo. Se ajustaron a 7x10<sup>4</sup> células por pocillo y se colocaron en una placa de 96 pocillos, fondo en “v”, se añadieron a cada pocillo 50  $\mu$ l de los sueros descomplementados y diluidos en HBSS de forma seriada y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Tras tres lavados se incubaron con 50  $\mu$ l de complemento diluido convenientemente durante 30 minutos, y se le añadieron 100  $\mu$ l de HBSS por pocillo resuspendiéndose bien y sedimentándose con una nueva centrifugación. Por último, se transfirieron 100  $\mu$ l del sobrenadante a una nueva placa con igual cantidad de líquido de centelleo (Optiphase Supermix, Finlandia) para el conteo en un contador de radioactividad  $\beta$  (Wallac, Finlandia).

De forma similar a los métodos anteriores se realizaron controles de liberación espontánea de Cr<sup>51</sup> incubando sólo células y sueros inactivos sin complemento, un control con complemento sin la presencia de sueros y un control de lisis total sometiendo las células a la acción de 50  $\mu$ l de una solución detergente de tritón 100x al 1% (Sigma, USA ).

Se calculó el porcentaje de citotoxicidad aplicando la formula:

PC= (Cuentas por minuto (cpm) de las muestras para cada dilución – cpm lisis espontánea) / (cpm lisis máxima – cpm lisis espontáneas) x 100

### 3.3. Ensayos de inmunofluorescencia

Éstos se realizaron siguiendo protocolos ampliamente discutidos en la literatura para estos ensayos<sup>128</sup> pero estableciendo previamente en cada caso las titulaciones de los Acs primarios o los secundarios utilizados para el marcaje directo o indirecto (IFI).

### **3.3.1. Detección de antígenos $\alpha$ Gal por marcaje directo.**

Las células (PK15, AOC40, L35 o PBL), previamente lavadas, se ajustaron a una concentración de  $3 \times 10^5$  células por pocillo, y se incubaron a 4°C en placas de 96 pocillos fondos “u” con 50  $\mu$ l de una dilución 1/150 de una IgY de pollo anti- $\alpha$ Gal, marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (0.47 mg/ml) (Ac mablemente cedido por Dr. M. Sykes, USA). Pasados 30 minutos las células se lavaron tres veces con solución FACS (Becton Dickinson, USA) para eliminar el exceso de Acs.

### **3.3.2. Detección de moléculas DAF por marcaje indirecto.**

Las células (PBL), previamente lavadas, se ajustaron a una concentración de  $3 \times 10^5$  células por pocillo, se incubaron a 4°C, en placas de 96 pocillos fondo “u”, con 50  $\mu$ l de una dilución 1/150 de un Ac monoclonal murino anti-DAF humano, (Pharmingen, Alemania). Pasados 30 minutos las células se lavaron tres veces con solución FACS, y se añadió en cada pocillo 50  $\mu$ l de una dilución de Acs secundario anti-F(ab')<sub>2</sub> murino marcado con FITC (DAKO, Dinamarca) la placa se incubó durante 30 minutos a 4°C y se lavó tres veces.

### **3.3.3. Detección de Acs totales anti-células porcinas:**

Los PBL porcinos, previamente lavados, se ajustaron a una concentración de  $3 \times 10^5$  células por pocillos y se incubaron a 4°C en placas de 96 pocillos fondo “u” con 50  $\mu$ l de una dilución 1/5 de los sueros problemas. Pasados 45 minutos las células se lavaron tres veces con solución FACS para eliminar la inespecificidad. Para determinar la clase de Ac anti-porcino unido a las células, se añadieron a las muestras por separado 50  $\mu$ l de una dilución 1/40 de Acs anti-IgM humana ( $\mu$  específicos) ó IgG humana ( $\gamma$



específicos) ambos marcados con FITC (Dako, Dinamarca) y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Finalmente fueron lavados de nuevo en condiciones similares a la anterior incubación.

En los tres tipos de marcaje las muestras se transfirieron a tubos para su lectura en el citómetro todas las muestras se resuspendieron en 400 µl de solución FACS y se incluyeron tubos controles, que incluían células y Acs secundarios marcados con FITC sin la presencia del Ac primario. De forma similar, a todos los tubos de los experimentos de inmunofluorescencia descritos, se les añadió 10 µl de solución IP para la exclusión de células muertas. Se analizaron un total de 8000 células por tubo, en un citómetro FACSScan (Becton Dickinson, USA) a través del programa CellQuest. Se calcularon las medianas de intensidad de fluorescencias (MFI) específicas de cada muestra por sustracción de las MFI de los tubos controles.

### **3.4. Cuantificación de Acs anti- $\alpha$ GAL por un método inmunoenzimático (ELISA).**

La presencia de Acs específicos dirigidos a epitopes  $\alpha$ Gal se cuantificó por un ELISA previamente usado en el laboratorio<sup>117</sup>. Las placas de 96 pocillos se recubrieron con 50 µl de Gal  $\alpha$ -1,3-Gal- $\beta$ -1,4-GlcNAc unido a albumina sérica humana a 5 µg/ml (14 residuos Gal promedios por molécula de albúmina) (Dextra Labs, USA), en tampón bicarbonato pH 9,6 y se incubaron durante toda la noche a 4°C.

Las placas se lavaron con el tampón PBS Tween 0,1%, y posteriormente se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con el mismo tipo de tampón al 0,5%. En cada pocillo se pusieron 50 µl de las muestras de los sueros diluidas de forma seriada y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se prepararon 2 tipos de placas independientemente, una para la medición de los Acs IgG y otra para los IgM. Tras la incubación, ambas placas se lavaron cinco veces y se añadieron por pocillo 50 µl de una dilución 1/1000 de Acs anti-IgG humanos ( $\gamma$  específicos) ó Acs anti-IgM humanos ( $\mu$  específicos) ambos obtenidos en cabra y marcados con peroxidasa (Sigma, USA) y



se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de igual forma a la expuesta anteriormente. La reacción se visualizó con la adición de 100µl de ortofenilendiamina (0,4 mg/ml) (Sigma, USA) y peróxido de hidrogeno 30% (40 µl/100ml), se paralizó a los 5 minutos con 50 µl ácido sulfúrico 1 M. Las DO se midieron en el lector espectrofotométrico a 492 nm de longitud de onda. Paralelamente, se incluyeron pocillos con tampón sin muestras como controles y cuyos valores de DO se restaron a los experimentales.

### **3.5. Detección de xenoantígenos porcinos por ensayos de inmunoprecipitación y Western Blot (WB).**

Para el estudio de antígenos reconocidos por los sueros de los babuinos (que fueron seleccionados en los estudios de absorción con hematíes), se realizó primero una inmunoprecipitación de los antígenos presentes en los lisados con los Acs contenidos en los sueros, luego se procedió a separar el precipitado por electroforesis en geles de SDS acrilamida en condiciones reducidas, tras el cual las proteínas obtenidas se transfirieron a membranas Immobilón-P<sup>S-Q</sup> para el desarrollo del WB. Se siguieron básicamente los protocolos propuestos por los fabricantes del Acs anti-IgM (Sigma, USA) usados en la precipitación.

#### **3.5.1. Obtención de los lisados biotinilados**

Marcaje de células con biotina: Los PBL, 20x10<sup>6</sup> células/ml o 1 ml de hematíes previamente lavados en PBS y solución salina isotónica fría respectivamente, se incubaron con 50 µl de la solución de biotina, durante 30 minutos a 4°C con agitación. Luego se lavaron en PBS tres veces a 300xg durante 7 minutos para eliminar el exceso de biotina.

Lisados celulares: Tras el marcaje con biotina, las células se incubaron con tampón de lisis 100x10<sup>6</sup> células/ml durante 1 hora a 4°C. El lisado fue pasado por una jeringa con aguja fina N° 25 (0,5 x 16 mm) (Icogamma, Italia) y centrifugado a 12000xg para

eliminar la fracción insoluble, posteriormente el sobrenadante fue preaclorado por absorción en 50 µl/ml proteína G-sefara (Amersham, Suecia) incubándose toda la noche a 4°C con rotación. Se centrifugó 12000xg durante 10 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se repitió el procedimiento nuevamente incubándose durante 1 hora, previo al paso de inmunoprecipitación.

### **3.5.2. Inmunoprecipitación.**

Tras la determinación de la concentración de los lisados biotinilados obtenidos, 20 µg se incubaron con 15 µl de varias diluciones de sueros desde 1/1 hasta 1/10 (para investigar la mejor relación antígeno/Acs) durante 2 horas 4°C con rotación. Luego se añadieron 20 µl anti-IgM humana-agarosa (µ específica) (Sigma, USA), previamente lavada, en PBS en 150 µl de tampón lisis. Se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C con rotación y se obtuvieron los inmunocomplejos por centrifugación a 12000xg que se lavaron 4 veces en iguales condiciones.

### **3.5.3. Electroforesis, transferencia y revelado de los antígenos.**

Electroforesis: A cada 12 µl de muestra se le añadieron 3 µl de tampón de carga y 1,2 µl de βmercaptoetanol (Bio-Rad, USA), las muestras se calentaron a 100°C durante 5 minutos y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida a varios porcentajes. Los geles al 12% produjeron las mejores condiciones de separación para nuestros experimentos. Los geles se corrieron a 120 voltios durante 80 minutos.

Transferencia y revelado: Tras este paso se realizó la transferencia de las glicoproteína a las membranas Immobilon-P<sup>S-Q</sup> (di-fluoruro de polivinilideno) (Millipore, USA) previamente empapadas en metanol, agua y metanol sucesivamente, durante 5 minutos en cada uno. Los geles con las proteínas separadas se lavaron en tampón de transferencia 15 minutos y la transferencia se realizó durante 35 minutos a 15 voltios, en sistema de transferencia semi-seco (Bio-Rad.USA). Las membranas con las proteínas transferidas se lavaron en agua destilada y se bloquearon en tampón bloqueo



toda la noche. Posteriormente se lavaron en tampón lavado 4 veces durante 15 minutos con agitación y se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Dako, Dinamarca) diluida 1/5 en tampón bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Por ultimo se lavaron 4 veces y se revelaron en sistema ECL (0,125 ml/cm<sup>2</sup> Amershan, UK), un sistema que aprovecha la oxidación del componente luminol por la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno con la consecuente emisión de luz que queda reflejada en una película radiográfica (AGFA, Belgica). La exposición de la película se realizó a distintos tiempos entre 1 y 10 minutos.

## **4. Diseño de los estudios**

El método CCCF para medir la citotoxicidad humoral fue adaptado expresamente para realizar la mayor parte de los experimentos que comprenden esta tesis. Por todo esto se realizó el diseño del método, se evaluó como presentar los datos obtenidos, la validez de estos utilizando diversas formas o modelos matemáticos, su sensibilidad y su flexibilidad.

### **4.1. Caracterización del método de exploración de la citotoxicidad humoral por citometría de flujo y validación del modo de expresión de los resultados.**

La caracterización de la actividad citotóxica de los sueros en condiciones basales por las vías endógena o exógena, se realizó a partir del análisis de muestras de un grupo de 7 babuinos no sometido a tratamiento alguno. A este grupo de muestras se le denominó a efecto de todos los experimentos grupo de sueros pre-trasplante.

La validez de utilizar los datos obtenidos tras el marcaje del marcaje Daf o del IP y su influencia en el cálculo de ULS se determinó analizando individualmente los diferentes PC calculados y las ULS derivadas de ambos tipos de PC utilizando el grupo de sueros pre-trasplante y un nuevo grupo constituido por muestras heterogéneas de suero procedentes de 5 babuinos trasplantados y sometidos a diferentes tratamientos inmunosupresores (ver lista general de tratamientos) al que



llamamos post-trasplante. La mejor alternativa en la búsqueda de una ULS se investigó, además, contrastando tres modelos matemáticos (VK, dos formas exponenciales y el calculo del área bajo la curva (AUC)) por su calidad de ajuste a las curvas y correlación entre ellos.

Por otra parte el grupo de muestras post-trasplante fue nuevamente inhibido “in vitro” tanto para las vías endógenas y exógenas del método, por concentraciones adecuadas de heparina de bajo peso molecular (Fraxiparin. Sanofi-synthelabo, Barcelona) y del GAS 914 (Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza) respectivamente. La sensibilidad de CCCF en cada tipo de vía (exógena/endógena) pudo comprobarse determinando su capacidad para evaluar el poder citotóxico de las muestras post-trasplante inhibidas, (con mínima citotoxicidad) y comparando sus resultados con otros métodos ya conocidos.

La flexibilidad del método para ser utilizado en varias circunstancias se demostró por la posibilidad de su empleo por ambas vías de activación, y por su capacidad para detectar citotoxicidad frente a varias células dianas.

#### **4.2. Detección de xenoanticuerpos dirigidos a antígenos expresados en células nucleadas y ausentes en hematíes.**

Para intentar determinar las diferencias en el reconocimiento antigénico de los sueros debidas a la presencia de Acs de diferentes especificidad en nuestros modelos experimentales de xenotrasplante cerdo/primate, se estudiaron 18 muestras de sueros procedentes de un grupo de 9 babuinos correspondientes en cada uno al estadio pre-trasplante y al momento del fallo del injerto (momento en que sufría RXHA). La acción citotóxica de los Acs presentes en cada muestra se investigó de forma paralela por EHC utilizando hematíes y mediante ensayo CCCF vía exógena utilizando PBL porcinos.

Las muestras que indicaban mayores diferencias entre los dos métodos mencionados se absorbieron con hematíes de cerdo normal y se evaluaron nuevamente por ambos tipos de ensayos. Para detectar cualquier variación producida por la pequeña dilución que sufren las muestras de sueros durante los procesos de absorción, se concentró uno de los sueros antes a la absorción y después de absorbido analizándose su efecto sobre la citotoxicidad medida en CCCF y EHC.

Por otra parte, se trató de analizar el nivel de xenoanticuerpos presentes en los sueros absorbidos y no absorbidos de los animales elegidos determinando la IgM e IgG total anti-porcinas por IFI o específicas anti- $\alpha$ Gal por ELISA.

Para tratar de identificar molecularmente los posibles antígenos reconocidos por estos xenoanticuerpos, las muestras de algunos sueros escogidos se analizaron por inmunoprecipitación de lisados celulares de PBL o hematíes de cerdos normales marcados con Biotina, separados por electroforesis en geles de poliacrilamida y analizados por la presencia de bandas en WB.

#### **4.3. Estudios de protección de DAF humano (hDAF), expresado en células de cerdos transgénicos, sobre la citotoxicidad de los sueros de babuinos.**

Para investigar el posible efecto protector de las moléculas hDAF en la citotoxicidad humoral del modelo xenogénico cerdo / primate, se analizó la citotoxicidad detectada por los métodos CCCF (endógeno ó exógeno) y EHC de 14 sueros de 7 babuinos divididos en periodos pre-trasplante y post-trasplante contra células porcinas transgénicas o normales.

Para explorar la posible variabilidad en la capacidad de protección inducida por esta molécula entre los distintos cerdos transgénicos, se comparó la capacidad citotóxica de los distintos sueros de babuinos frente a células de un mismo cerdo transgénico (cerdo 751) y la capacidad del SHN sobre células de 9 cerdos transgénicos.



Se estudió la posible relación entre las moléculas teóricamente más implicadas en los mecanismos de protección a la citotoxicidad de estos modelos, hDAF,  $\alpha$ GAL y las distintas clases de Igs anti- $\alpha$ Gal. Para ello por un lado se investigó la expresión por IFI de moléculas hDAF y antígenos  $\alpha$ Gal en la superficie de los PBL de los distintos cerdos transgénicos y su posible relación con la capacidad citotóxica observada en el SHN y por otro lado los títulos de Acs anti- $\alpha$ Gal de los diferentes babuinos y la variación del grado de citotoxicidad de estos frente a células del cerdo transgénico.

La capacidad del método CCCF para medir la citotoxicidad del complemento endógeno en los sueros se aprovechó para:

- a) Evaluar la capacidad protectora del transgen en un ensayo libre de Acs citotóxicos propios (anti- $\alpha$ Gal en su mayoría) induciendo citotoxicidad con IgM monoclonal murina en distintos cerdos.
- b) Analizar la capacidad citotóxica de los sueros teniendo en cuenta el grado de homología entre el complemento de cada especie y la protección al daño citotóxico ofrecida por hDAF.

Para inducir la sensibilización de las células con los Acs anti-cerdos se emplearon 50  $\mu$ l de una IgM monoclonal anti-porcina (0,5 mg/ml) (Pharmingen, USA) a dilución 1/70 con capacidad para activar complemento por la vía clásica sobre un amplio reconocimiento de células porcinas, incluyendo todas las estirpes hematopoyéticas.

## **5. Procesamiento y análisis estadísticos de los datos**

### **5.1. Definición de ULS y modelos matemáticos.**

Para resumir la actividad citotóxica de varios sujetos o muestras testadas se evaluó el uso de ULS, que se definió como el valor de dilución de la muestra en la que ocurre el 50% de la lisis celular independientemente del método para estimarla. Cuando fue necesario comparar diferentes grupos de experimentos, fue conveniente el empleo del



cálculo de ULS relativas (ULR) a fin de garantizar mejor la reproducibilidad y hacer las comparaciones entre los valores estandarizados. Para calcular las ULR se dividió el valor de ULS de la muestra experimental entre el valor de ULS del control SHN ensayado paralelamente.

Para la validación de las ULS comparamos los valores generados por CCCF, con los otros métodos EHC, o ensayo Cr<sup>51</sup>, por los diferentes modelos matemáticos y más frecuentemente utilizados en estudios de citotoxicidad:

- La ecuación de VK<sup>122</sup>, conocida como  $\log x = \log K + 1/n (\log (y/1-y))$  en su forma lineal, pero que aquí se usó en la forma original  $y = 1/(1+(K/x)^n)$  para cálculo iterativo.
- Los modelos exponenciales propuestos por Pross et-al<sup>129</sup>, en ensayos de citotoxicidad celular (EP)  $y=A(1-e^{-kx})$ , teniendo en cuenta dos variantes producidas por la elección de las asíntotas (A), la estimadas por calculo matemático iterativo (EPI), o la tomada directamente como constante del mayor porcentaje de lisis obtenida experimentalmente (EPE).
- El cálculo de las áreas bajo la curva (AUC) definida entre los porcentajes de citotoxicidad y el valor de las diluciones<sup>117,124</sup>.

Para ambas ecuaciones, “y” es el porcentaje de lisis obtenida para cada valor de dilución “x” evaluado, el valor de la pendiente “n” y la constante “K” son los parámetros a estimar en el modelo VK. De la misma forma para EP, la constante “K” y la asíntota “A” son los parámetros a estimar si A no ha sido fijada experimentalmente como en la variante EPE.

La AUC fue definida como la suma de las áreas individuales por intervalos de dilución (d) desde la primera dilución (d<sub>1</sub>) hasta la penúltima (d<sub>n-1</sub>). El cálculo se realizó con la ayuda una hoja en sistema informático Excel 2000. El área para un intervalo entre diluciones (d<sub>i</sub>; d<sub>i+1</sub>) se calculó a partir de los porcentajes PC en las curvas de citotoxicidad y el valor de las diluciones  $(PC_i + PC_{i+1})/2 * (d_{i+1} - d_i)$ .

## **5.2. Procedimientos estadísticos generales**

Para determinar los parámetros de las ecuaciones ya descritas se empleó el sistema informático automatizado “GraFit4” que incluye un método de cálculo iterativo basado en algoritmo Marquart (Erithacus Software. USA). Para el cálculo de las AUC se diseñó una hoja de cálculo en sistema Excel ver. 2000.

Para la elección del mejor modelo matemático usamos el mismo sistema GraFit4, que realizó una prueba “F” comparando el ajuste de los datos a los modelos<sup>130</sup>. El resto de las comparaciones estadísticas: coeficientes de correlación paramétricos (Pearson), no paramétricos (rho Spearman), comparaciones de medias, etc que oportunamente se señalan en “resultados se realizaron a través de sistema SPSS ver11. Se consideró significativa las  $p < 0,05$  en todos los análisis efectuados

## 6. Relación general de los babuinos usados para la obtención de muestras en los distintos experimentos: tipo de trasplante, tratamiento y supervivencia.

Babuino	xenotrasplante	Inmunosupresion	Supervivencia
A14	cardiaco	Csp, Csf, ERL, Mpd	22 días
A24	cardiaco	Esplenectomía, Csp, Csf, ERL, Mpd	18 días
B31	cardiaco	Csp, Csf, ERL, Mpd	6 días
B32	cardiaco	Csp, Csf, ERL, Mpd	10 días
B41	cardiaco	Gas 914, Plasmaferesis, Csp, Csf, ERL, Mpd	29 días
B42	cardiaco	Csp, Csf, ERL, Mpd	17 días
B43	cardiaco	Csp, Csf, ERL, Mpd	14 días
B47	cardiaco	Csp, Csf, ERL, Mpd	9 días
D12	cardiaco	GAS 914 Csp, Csf, ERL, Mpd	7 días
D40	cardiaco	GAS 914, Mdp	6 días
C51	renal	GAS 914, Basiliximab, FTY, Mdp	13 días
C52	renal	GAS 914, Csf, FTY, Mdp	8días
C53	renal	GAS 914, Csf, ERL, Mpd	1 día
C68	renal	GAS 914, Basiliximab, Csp, FTY, Mdp	8 días
C78	renal	GAS 914, Csp, Csf, ERL, Mdp	4días

### Protocolos de tratamientos

GAS 914: (5 mg/kg/día) días -17,-14,-11. (1 mg/kg/día) desde el -5 hasta día de trasplante. (1 mg/kg/12horas) desde trasplante hasta el rechazo.

Ciclosporina (Csp): Dosis variable para mantener 1000-1500 ng/ml en sangre diaria.

Ciclofosfamida (Csf): 40-20-20 mg (días -2, 0, +2) ajustable según cuenta leucocitaria.

Mofetil micofenilato (ERL): 35- 100 mg/kg/día.

(FTY): 0,2-0,3 mg/kg/día.

Basiliximab (Acs monoclonal anti-CD25): 20 mg (días 0,+4)

Metil-predisona (Mdp). 1-0,3 mg/ml/día en esquema decreciente.



## ***RESULTADOS***

## IV. RESULTADOS

### 1. Diseño y caracterización del método CCCF.

Para la caracterización del método CCCF, y en particular para la validación de la forma de expresión de su resultado, se analizaron experimentos realizados a partir de un grupo de sueros pre-trasplante en algunas ocasiones y en otras de un grupo de muestras post-trasplante a través de distintos procedimientos estadísticos.

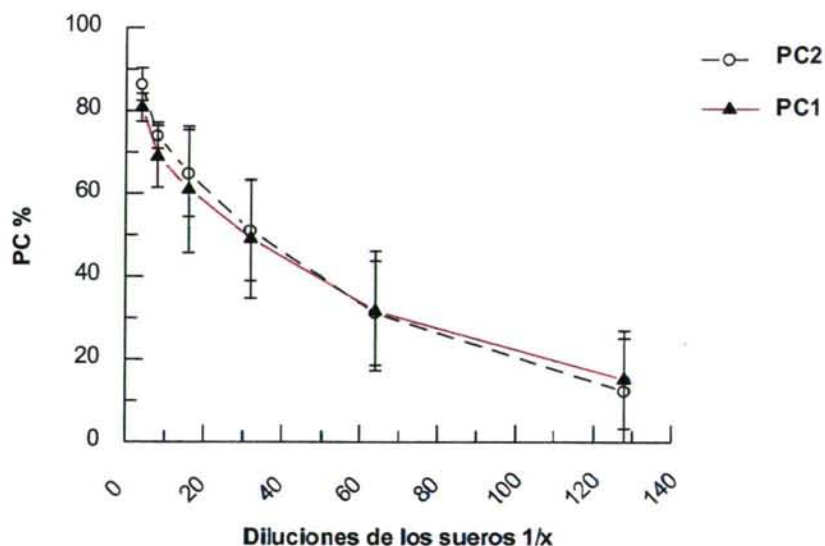
#### 1.1. Descripción de las curvas de citotoxicidad obtenidas en CCCF con doble marcaje. Correlación entre las vías endógena y exógena de CCCF.

Los ensayos se realizaron en principio solo en el grupo de sueros de babuinos pre-trasplante empleando como dianas células PK15, tras optimizar las condiciones para las vías exógena y endógena del método. El aspecto típico de las curvas promedios de la respuesta citotóxica medida por CCCF es el reflejado en los siguientes gráficos. (Figura 1a y b).

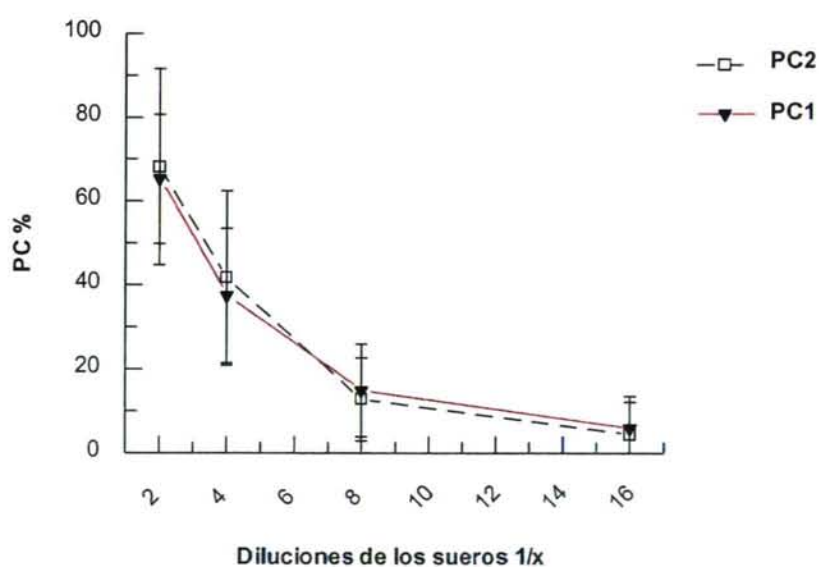
Para la vía exógena del método (Figura 1a), el punto de máxima lisis se logró entre las diluciones 1/3 y 1/4. En este último punto el PC que pueden alcanzar las muestras analizadas en su conjunto se situó como promedio en el  $80,23 \% \pm 3,23$  para IP y  $86,39\% \pm 3,90$  para Daf, según la cuantificación realizada por PC<sub>1</sub> o PC<sub>2</sub>. La actividad citolítica se mantuvo hasta la dilución 1/128 ó 1/256. En 1/128, el mínimo promedio para PC<sub>1</sub> fue de  $15,98 \pm 14,00$  mientras que para PC<sub>2</sub> fue de  $12,43 \pm 12,67$ .

La exploración de la vía endógena del ensayo con el mismo grupo de sueros (Figura 1b), mostró menor poder citotóxico que cuando estos se analizaron por la vía exógena. Los niveles de citotoxicidad máximos se obtuvieron con los sueros sin diluir o a la dilución 1/2, siendo los valores promedios de  $65,30 \pm 15,50$  para PC<sub>1</sub> y  $68,18 \pm 23,42$  para PC<sub>2</sub>. Tras esta dilución la actividad citolítica descendió y fue patente hasta

diluciones entre 1/16 y 1/32. En la dilución 1/16 se detectó un promedio  $PC_1$  de  $5,07 \pm 7,36$  y  $PC_2$  de  $3,85 \pm 7,22$ .



**Figura 1a:** Curva de citotoxicidad promedio para el método CCCF exógeno (n=7). La alta coincidencia entre los puntos promedios de  $PC_1$  o  $PC_2$  representa una correlación del 0,987.

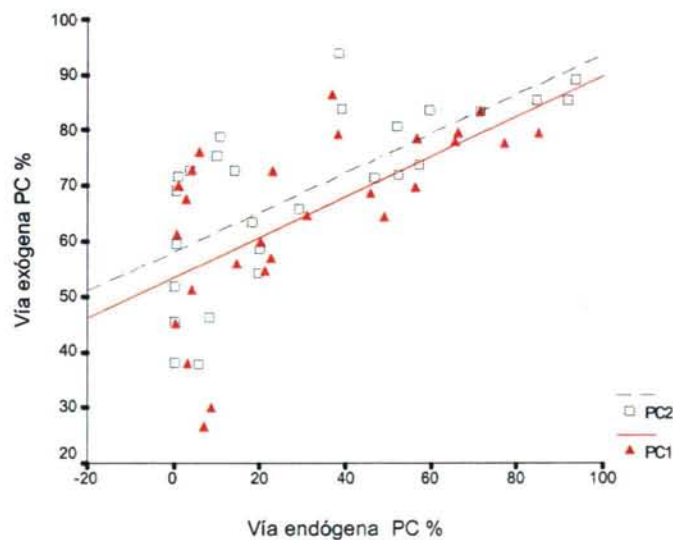


**Figura 1b:** Curva de citotoxicidad promedio para el método CCCF endógeno (n=7). La alta coincidencia entre los puntos promedios de  $PC_1$  o  $PC_2$  representa una correlación del 0,965.



El grado de paralelismo observado entre ambas curvas IP / Daf para la vías exógenas y endógena (Figuras 1a y b) fue grande. Traducido a términos de correlación significó que para CCCF exógeno,  $PC_1$  y  $PC_2$  expresan un coeficiente de Pearson 0,987  $p < 0,001$   $n=47$  y para CCCF endógeno el coeficiente fue de 0,965  $p < 0,001$   $n=27$ , esta alta correlación trajo como consecuencia resultados similares en el cálculo de ULS (como se vio posteriormente).

Otro grado de correlación significativo fue el obtenido entre la medición de la actividad endógena o exógena de los sueros pese al diferente grado de intensidad en las lisis obtenidas por cada vía. Para las muestras pre-trasplante, los coeficientes de correlación entre CCCF exógeno y CCCF endógeno, evaluando  $PC_1$ , fue de Pearson=0,622  $p < 0,001$   $n=27$ , la misma relación para  $PC_2$  fue 0,688  $p < 0,001$   $n=28$ , lo que respalda la validez de ambos procedimientos experimentales (Figura 2).



**Figura 2:** Correlación de las vías exógenas y endógenas para CCCF en el grupo de muestras pre-trasplantes. La correlación ( $PC_1 = 0,622$ ;  $PC_2 = 0,688$ ) fue alta independientemente del tipo de marcaje.

## 1.2. Efectos de la cuantificación por PC<sub>1</sub> o PC<sub>2</sub> en el cálculo de ULS.

Para evaluar el posible efecto del uso de los PC derivados del marcaje con IP o Daf en el cálculo de ULS obtenidas por CCCF, se ajustó individualmente una curva para PC<sub>1</sub> y otra para PC<sub>2</sub>, con cada una de las muestras de sueros comprendidas en los grupos pre-y post-trasplante de un ensayo con CCCF exógeno. Las curvas se ajustaron mediante modelo matemático iterativo VK y se calculó el valor de ULS al 50 %.

En las Tablas Ia (sueros pre-trasplante) y Ib (sueros post-trasplante) se muestran las cifras de ULS y del error estándar (ES) asociado al cálculo de la unidad para cada uno de los sueros. Se observó solo una pequeña diferencia entre las ULS halladas por PC<sub>1</sub> o por PC<sub>2</sub> para un mismo suero, pero de forma general las diferencias entre las medias de ambos grupos fueron insignificantes,  $ULS\ PC_1 = 30,30 \pm 12,49$  y  $ULS\ PC_2 = 30,47 \pm 17,85$  para las muestras del grupo pre-trasplante, siendo las  $ULS\ PC_1 = 1,31 \pm 0,75$  y  $ULS\ PC_2 = 1,40 \pm 0,76$  para el grupo post-trasplante del estudio. Al mismo tiempo estos datos reflejaron, como era de esperar, una gran diferencia entre la citotoxicidad medida para los dos grupos pre-trasplante y trasplantados, independientemente del uso de PC<sub>1</sub> o PC<sub>2</sub>.

La exactitud en el cálculo de la ULS fue similar entre PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub> en todas las muestras ensayadas. Atendiendo al rango individual de los ES para cada muestra, y a la variación experimentada por el conjunto de todos los ES, los porcentajes fueron pequeños. Para PC<sub>1</sub> la variación en la cifra promedio de la ULS fue del 13,96 %, mientras que la variación para PC<sub>2</sub> fue del orden del 15,34 %, no superándose el 20 % de las ULS en ninguna de las 24 muestras evaluadas, con excepción del suero C51 en PC<sub>1</sub>.

Muestras	PC <sub>1</sub> (IP)		PC <sub>2</sub> (Daf)	
	ULS 50%	ES	ULS 50%	ES
A14	26,37	3,77	26,43	3,63
A24	10,50	1,24	17,23	1,92
B32	22,25	3,04	23,47	3,47
B41	18,13	1,70	20,98	1,51
B42	61,18	10,80	46,56	7,87
B43	26,58	3,78	28,44	3,44
B47	48,31	8,42	48,97	7,78
<b>X</b>	<b>30,47</b>		<b>30,30</b>	
<b>SD</b>	<b>17,85</b>		<b>12,49</b>	

**Tabla Ia:** ULS calculadas al 50% para PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub> a través del ajuste del modelo VK a partir de los datos obtenidos por CCCF exógeno en el grupo de muestras pre-trasplante.

Muestras	PC <sub>1</sub> (IP)		PC <sub>2</sub> (Daf)	
	ULS 50%	ES	ULS 50%	ES
C51	0,67	0,31	0,59	0,01
C52	2,00	0,38	2,22	0,49
C53	1,37	0,22	1,56	0,27
C78	2,07	0,14	2,00	0,18
D40	0,42	0,03	0,63	0,09
<b>X</b>	<b>1,31</b>		<b>1,40</b>	
<b>SD</b>	<b>0,75</b>		<b>0,76</b>	

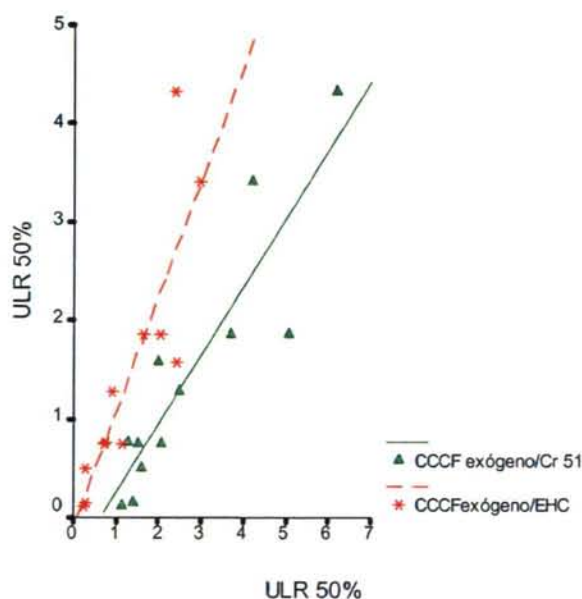
**Tabla Ib:** ULS calculadas al 50% para PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub> a través del ajuste del modelo VK a partir de datos obtenidos por CCCF exógeno en el grupo de muestras post-trasplante. Los valores de ULS y la dispersión de los datos muestran la gran similitud entre los dos marcajes para ambos grupos.



Teniendo en cuenta el grado de correlación entre las vías endógenas y exógenas de la técnica, y sobre todo la equivalencia en el uso de  $PC_1$  o  $PC_2$ , para el análisis de los datos obtenidos en el resto de los experimentos incluidos en el apartado 1 de resultados se utilizó exclusivamente el valor de  $PC_1$  en CCCF exógeno.

### 1.3. Comparación de los resultados de CCCF con otros métodos de detección de citotoxicidad.

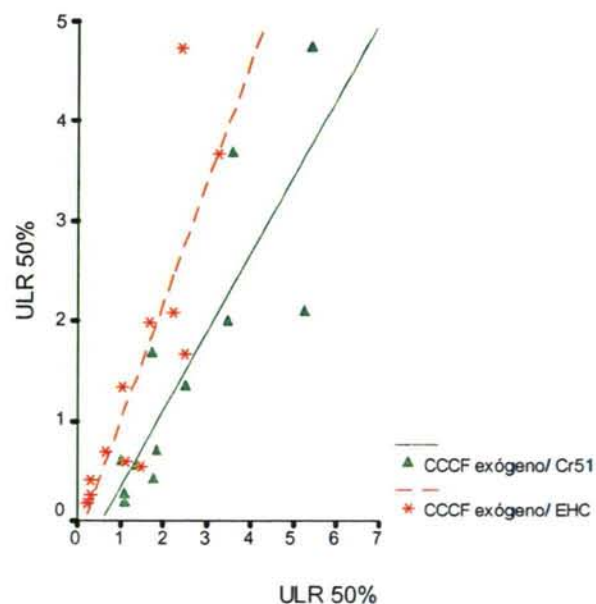
Para determinar si los resultados obtenidos por CCCF son equivalentes a los obtenidos por otros métodos utilizados ampliamente en la evaluación de la citotoxicidad humoral (aunque basan sus mecanismos en principios algo diferentes), se correlacionaron los valores ULR determinados por CCCF con otros dos métodos: EHC y el ensayo con liberación de  $Cr^{51}$ . La evaluación de la citotoxicidad de las 12 muestras de sueros estudiadas (pre-y post-trasplante) mediante los tres métodos propuestos mostró buena correlación entre las ULR obtenidas con cada método (Figura 3a) usando el modelo matemático VK.



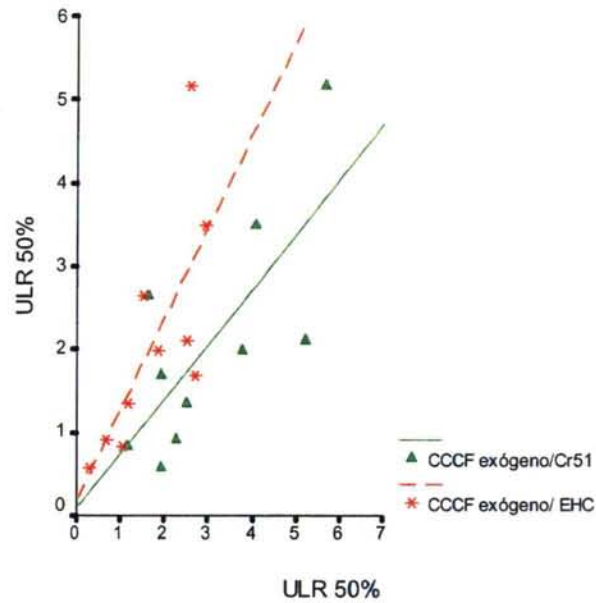
**Figura 3a:** Correlación entre CCCF exógeno y los métodos EHC y  $Cr^{51}$  usando el modelo VK para el cálculo de las ULS.

Sin embargo como el valor de ULS es una magnitud derivada del modelo matemático usado hasta el momento, se procedió a analizar si obteníamos resultados similares realizando correlaciones entre los mismos métodos experimentales, pero utilizando para el análisis de los datos el resto de los modelos matemáticos comentados en el apartado de “Materiales y Métodos”.

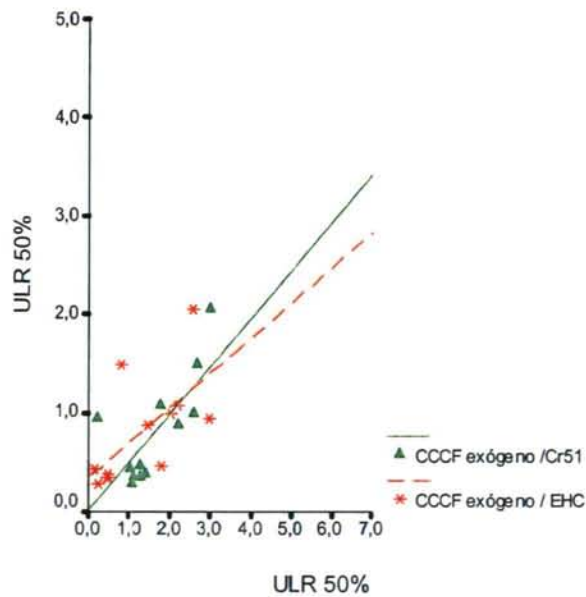
Los resultados obtenidos aplicando los modelos EPE, EPI y AUC se muestran en las Figuras 3b, c y d, respectivamente. Analizando en resumen todos estos datos (Tabla II) observamos que comparando las correlaciones obtenidas entre estos métodos según los modelos aplicados, el mejor coeficiente se obtuvo con CCCF y EHC por el modelo de VK (0,910) y este mismo modelo matemático mostró la segunda mejor correlación entre CCCF y  $\text{Cr}^{51}$  (0,874). Para los modelos EP las correlaciones también fueron significativamente buenas, excepto para CCCF y  $\text{Cr}^{51}$  usando EPI que fue notablemente mas baja (0,612) y donde los valores reducidos de la asíntota obtenida por el procedimiento iterativo impidieron calcular la ULS al 50% en dos muestras. Finalmente, los datos con AUC fueron en general los de más baja asociación con los dos métodos aunque sus resultados permanecieron estadísticamente significativos.



**Figura 3b:** Correlación entre CCCF exógeno y los métodos EHC y  $\text{Cr}^{51}$  usando el modelo EPE para el cálculo de las ULS.



**Figura 3c:** Correlación entre CCCF exógeno y los métodos EHC y Cr <sup>51</sup> usando el modelo EPI para el cálculo de las ULS.



**Figura 3d:** Correlación entre CCCF exógeno y los métodos EHC y Cr <sup>51</sup> usando el modelo AUC para el cálculo de las ULS.



Modelo	Correlación		Correlación		N
	CCCF / EHC		CCCF / Ensayo Cr <sup>51</sup>		
	Rho		Rho		
Matemático	Spearman	P	Spearman	P	
VK	0,910	0,000	0,874	0,000	12
EPE	0,874	0,000	0,860	0,000	12
EPI	0,806	0,002	0,612	0.030	10**
AUC	0,762	0,002	0,673	0,008	12

**Tabla II:** Correlaciones entre CCCF y los otros métodos de evaluación de la citotoxicidad humoral según el tipo de modelo matemático aplicado al ajuste de las curvas. Las mejores asociaciones se obtuvieron para el modelo VK. Los bajos valores de la A obtenidos con el procedimiento EPI \*\* imposibilitaron el cálculo de la ULR al 50% para dos muestras (B41, B42).

#### 1.4. Grado de ajuste de los puntos a las curvas generadas en los distintos modelos matemáticos empleando CCCF.

La buena asociación demostrada entre los pares de métodos experimentales no necesariamente implicaba la superioridad de un modelo matemático para representar un grupo determinado de datos de citotoxicidad, sino más bien el grado de correspondencia entre los diferentes modelos. Por ello se investigó si el modelo VK, previamente usado, era mejor realmente que los modelos exponenciales en el ajuste de los PC en cada curva individualmente. Dado que el cálculo de AUC no conlleva el ajuste de funciones, este modelo no fue susceptible de contrastar mediante este tipo de análisis.

La prueba F del “GraFFit”, empleada para conocer las posibles diferencias entre el ajuste de dos modelos no mostró diferencias estadísticas entre el uso de VK y el de EPI, (Tabla III, columna 3ª). Por otra parte, en la comparación VK vs EPE tres casos (B42, C51, D40) se ajustaron significativamente mejor por VK que por EPE (columna 2ª). Al mismo tiempo, en la comparación EPI vs EPE cuatro casos (A14, B41, B42, D40) mostraron mejor ajuste por EPI que por EPE (columna 4ª).

Las muestras B42 y D40 tuvieron valores de probabilidades significativamente bajas en el análisis comparativo VK vs EPE y lo fueron también en el análisis EPI vs EPE. Otras dos muestras, B41 y C51, con probabilidades también de resultar diferentes en ambas comparaciones (3 columnas 2ª y 4ª) obtuvieron significación estadística en una de las dos comparaciones ( $p=0,02$  para B41 en EPI vs EPE y  $p<0,00$  para C51 en VK vs EPE), pero estuvieron muy próximas a la significación estadística en las otras ( $p=0,06$  para B41 en VK vs EPE y  $p=0,08$  para C51 en EPI vs EPE). Estos datos reflejaron una coincidencia de casi todas las muestras en las comparaciones individuales y sugirió cierta equivalencia para el ajuste entre VK y EPI con mejores posibilidades de ambos respecto a EPE, probablemente debido a que el valor de la “A” experimentalmente escogido no fuera igualmente bueno para todos los casos en EPE. Una pequeña ventaja añadida para VK pudo estar relacionada con la posibilidad de calcular siempre un valor de ULS al 50 % en todos los casos lo cual no fue posible para EPI como ya se comentó.

Muestras	VK / EPE	VK / EPI	EPI / EPE
	P	p	P
A14	0,16	0,33	0,01*
A24	0,34	0,65	0,10
B32	0,16	0,84	0,10
B41	0,06	0,73	0,02*
B42	0,01*	0,93	0,01*
B43	0,26	0,50	0,05
B47	0,16	0,32	0,36
C51	0,00*	0,18	0,08
C52	0,27	0,92	0,34
C53	0,27	0,70	0,96
C78	0,07	0,60	0,21
D40	0,00*	0,10	0,02*

**Tabla III:** Comparación entre los modelos EP y VK en el ajuste de las curvas de citotoxicidad CCCF. Las probabilidades significativas de encontrar superioridad de un modelo respecto al otro (\*) se localizaron en las comparaciones VK vs EPE y EPI vs EPE, coincidiendo esta significación casi en las mismas muestras.



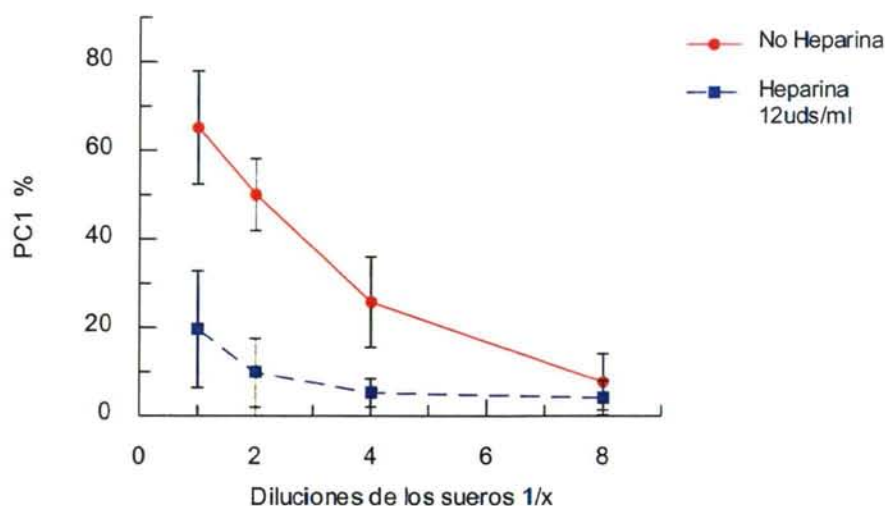
### **1.5. Análisis de la sensibilidad funcional del método CCCF y de su posible aplicación a otras dianas celulares.**

Para evaluar el grado de sensibilidad funcional del ensayo CCCF, con las muestras del grupo post-trasplante (que muestran “per se” muy bajo nivel de citotoxicidad) se realizaron experimentos de inhibición en presencia de: 1) heparina de bajo peso molecular para tratar de inhibir el complemento propio (inhibición de la vía endógena) ó 2) GAS 914 para inhibir la actividad citotóxica dependiente de Acs (inhibición de la vía exógena).

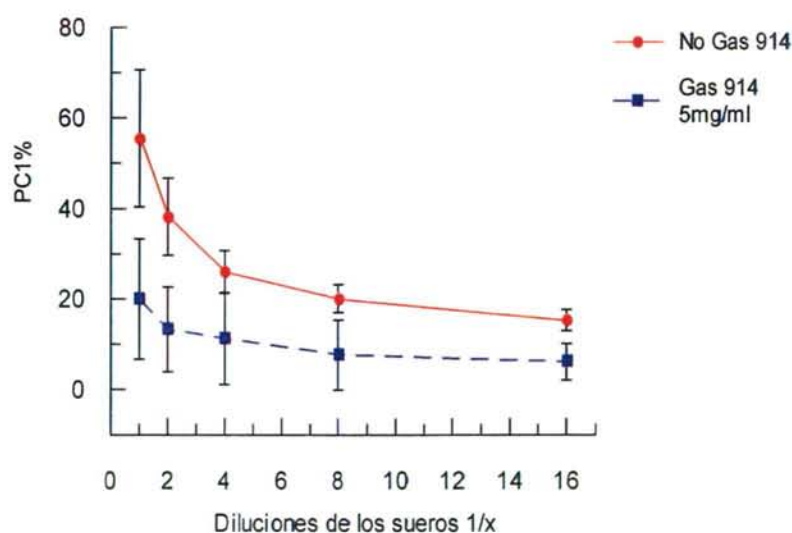
La heparina de bajo peso molecular redujo la citotoxicidad de las muestras de los sueros de forma dosis dependiente. La dosis de 12 UI/ml produjo una reducción promedio de ULS de 80,46 % respecto al grupo de sueros post-trasplante sin heparina (Figura 4a). Cuando se incrementó la dosis de heparina, esta llegó a abolir totalmente la actividad citolítica medida por CCCF endógeno sobre las células PK15.

De igual modo, la incubación de los sueros con GAS 914 redujo la citotoxicidad de estos de forma dosis dependiente hasta niveles muy bajos, seguramente debido a su efecto neutralizante sobre los Acs anti- $\alpha$ Gal. La dosis mínima que produjo la máxima inhibición fue de 6 mg/ml, con ella se obtuvo un 86,09 % de reducción respecto al grupo post-trasplante sin GAS 914 (Figura 4b). A diferencia de la heparina, el incremento de la dosis del GAS 914 hasta 50 mg/ml no pudo eliminar la pequeña actividad citotóxica residual de los sueros explorados por CCCF exógeno sobre las células PK15.

Estos experimentos demostraron que la actividad lítica detectada por el método CCCF en muestras de citotoxicidad baja conocida (grupo post-trasplante) puede ser inhibida aun más “in vitro” por la administración de ambas sustancias, sugiriendo un alto grado de sensibilidad para la evaluación funcional de la citotoxicidad mediante CCCF en cualquiera de sus dos formas.



**Figura 4a:** Inhibición del complemento endógeno por heparina de bajo peso molecular. El valor promedio de ULR en el grupo post-trasplante fue  $0,70 \pm 0,39$  mientras que el promedio después de la inhibición fue de  $0,14 \pm 0,15$  ULR.

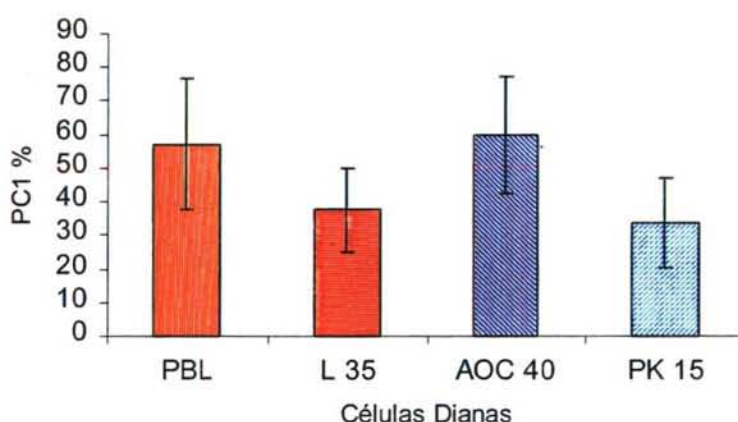


**Figura 4b:** Inhibición de Acs citotóxicos por GAS 914. El valor promedio de ULR en el grupo post-trasplante fue de  $0,91 \pm 0,62$  mientras que el promedio después de la inhibición fue de  $0,13 \pm 0,12$  ULR.

Para demostrar la utilidad del método CCCF en la exploración de la citotoxicidad humoral utilizando dianas celulares de diferentes orígenes se examinó la citotoxicidad

del SHN, por las vías endógena y exógena, frente a otras células: PBL, L35, y AOC40. La evaluación de estas células mediante el método CCCF mostró diferentes grados de sensibilidad al daño citotóxico en dependencia de su naturaleza celular pero las formas de las curvas citotóxicas fueron similares a las obtenidas con PK15 ya mostrada en las Figuras 1a y b a principios de este apartado.

Las células aquí evaluadas fueron sensibles en mayor o menor medida al daño citotóxico inducido por SHN a una concentraciones intermedia elegida previamente (1/8) por CCCF exógeno (Figura 5). Sin embargo, el promedio de citotoxicidad fue algo más alto para las células AOC40 ( $PC_1=59,82 \pm 17,90$ ) y los PBL porcinos frescos ( $PC_1=57,12 \pm 19,57$ ) que para PK15 ( $PC_1=33,69 \pm 13,05$ ) o L35 ( $PC_1=37,64 \pm 12,77$ ) aunque sin significación estadística entre ellas (Kruskal Wallis  $p=0,115$   $n=4$ ).



**Figura 5:** Sensibilidad de diferentes tipos de células porcinas a la citotoxicidad humoral. Un mismo número de células experimentaron diferentes grados de muerte en CCCF exógeno inducida por SHN (1/8).

Todos estos resultados indican que la cuantificación de la actividad citotóxica humoral mediante método de CCCF puede ser realizada por vía endógena y exógena frente a varios tipos de células dianas y expresarse convenientemente en valores de ULS 50% usando el procedimiento conocido de VK.

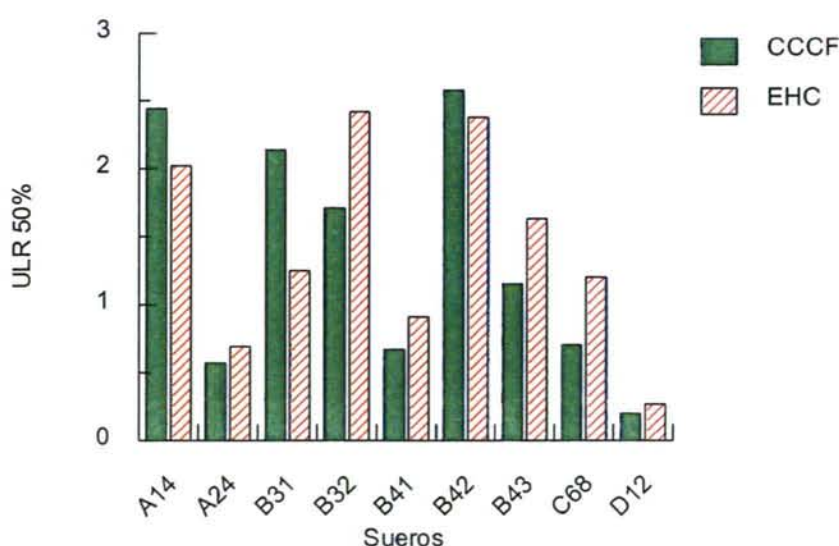


## 2. Estudios de los Xenoanticuerpos de babuinos dirigidos a epitopes expresados en PBL y ausentes en hematíes porcinos.

### 2.1 Citotoxicidad de los sueros pre-trasplante y en el momento RXHA analizada por EHC o CCCF exógeno.

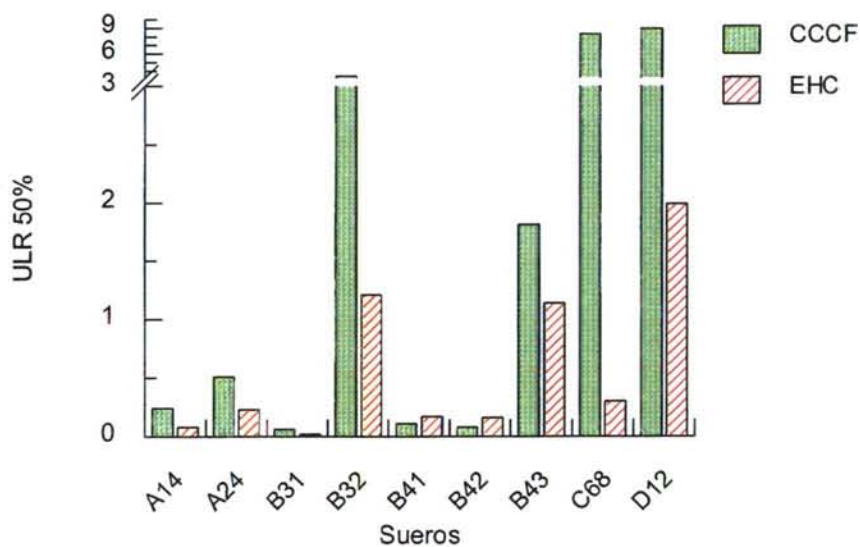
Para analizar posibles diferencias en la citotoxicidad mediada por xenoanticuerpos de los sueros de babuinos frente a células dianas diferentes, se estudiaron de forma paralela por los métodos EHC y CCCF exógeno los sueros de un grupo de 9 babuinos de los que de cada uno se escogieron dos muestras: una pre-trasplante y otra correspondientes al momento del RXHA (tomada justo antes de la necrosis).

El análisis funcional de la citotoxicidad en el grupo de sueros pre-trasplante frente a los hematíes porcinos (determinados por EHC) o a PBL porcinos (determinado por CCCF exógeno) no mostró diferencias notables (Figura 6a). Las medianas para cada tipo de ensayos fueron de: 1,25 ULR (rango 0,27-2,42) para ECH y 1,15 ULR (rango 0,20-2,58) para CCCF exógeno.



**Figura 6a:** Comparación de los valores de citotoxicidad obtenidos por CCCF y EHC en el grupo de sueros pre-trasplantes.

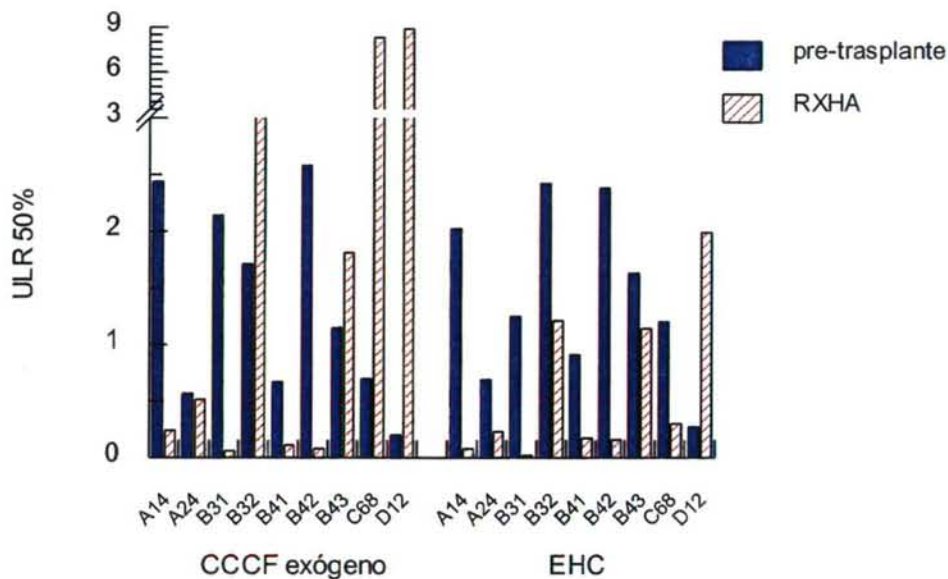
Cuando se evaluaron del mismo modo los sueros obtenidos en el momento del RXHA, los resultados demostraron más diferencias entre los valores obtenidos por EHC o CCCF (Figura 6b), estas diferencias se centraron en las muestras B32, B43, C68, y D12. La mediana del grupo detectada por EHC fue de 0,23 ULR (rango 0,02-1,99) mientras que la mediana para los sueros estimada por CCCF exógeno fue de 0,51 ULR (rango 0,06-8,89), demostrándose por tanto por ambos métodos una tendencia a la disminución substancial de la citotoxicidad en el momento RXHA respecto al pre-trasplante.



**Figura 6b:** Comparación CCCF y EHC en el grupo de sueros en el momento RXHA. Las muestras B32, B43, C68, y D12 tienen valores de citotoxicidad por CCCF significativamente superiores a los de EHC.

El análisis comparativo individual entre las muestras correspondientes a cada animal en el periodo pre-trasplante y en el momento del RXHA (Figura 6c) demostró que por CCCF de las 9 muestras 4 habían disminuido su citotoxicidad en el momento de la necrosis (A14, B31, B41, B42), otras 4 lo habían aumentado (B32, B43, C68, D12) y una apenas la varió (A24); por EHC, de las 9 muestras 8 habían disminuido las cifras de ULR respecto a sus valores pre-trasplante mientras que una lo había incrementado (D12). Un resultado significativo fue que 4 sueros (44,44% del total) tuvieron mayores

títulos de ULR en el momento del RXHA y en particular que las muestras B32, C68 y D12 mostraran diferencias notablemente mayores al ser testadas por CCCF frente a los resultados ofrecidos por EHC, lo que sugirió diferencias en la citotoxicidad medida por CCCF respecto EHC posiblemente debidas a la presencia de epitopes diferentes en las células dianas empleadas en cada método.



**Figura 6c:** Comparación de los valores de citotoxicidad con cada animal entre las muestras pre-trasplante y en el momento RXHA por CCCF exógeno y EHC

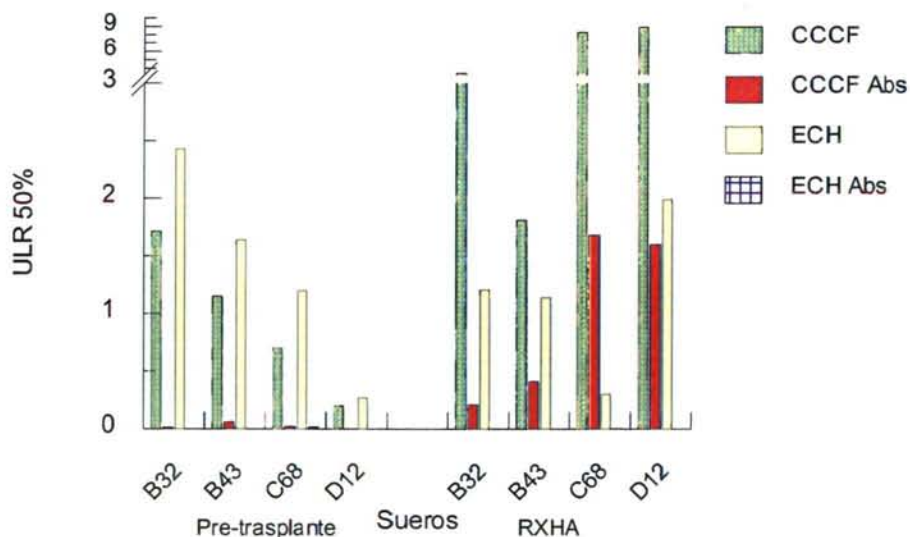
## 2.2 Citotoxicidad en las muestras pre-trasplante y correspondientes al RXHA medidas por EHC ó CCCF después de la absorción de los sueros con eritrocitos de cerdo normal.

Para tratar de detectar Acs de babuinos dirigidos contra los epitopes porcinos expuestos en PBL que no se hallasen en los hematíes de los cerdos, las 4 muestras que habían demostrado mayor actividad citotóxica por el método CCCF respecto al EHC en el momento de RXHA: B32, B43, C68 y D12 se absorbieron con hematíes de cerdo (según lo descrito en el apartado de “materiales y métodos”). Las variaciones registradas entre las mediciones realizadas antes y después de absorción fueron



expresadas en porcentajes residuales, es decir, como porcentajes de los valores tras la absorción respecto a los iniciales

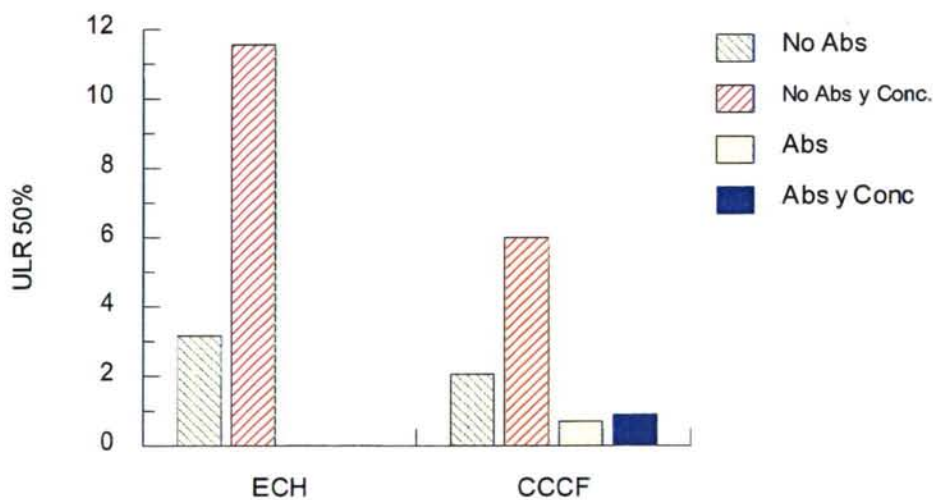
La absorción con eritrocitos porcinos de los sueros pre-trasplante y en RXHA correspondientes a los 4 babuinos señalados eliminó los Acs detectados por el ECH en ambos grupos (Figura 7). Por el contrario, por CCCF se observó un porcentaje residual de citotoxicidad mínima con mediana 0,017 ULR (rango 0,000-0,060) en los sueros pre-trasplante y mucho mayor en las muestras RXHA con mediana de 1,006 ULR (rango 0,210-1,68). Estos resultados indicaron la existencia de un 1,84% de la actividad residual medida por CCCF en las muestras pre-trasplante absorbidas, que pasó a un 17,21% en el momento del RXHA (porcentajes residuales).



**Figura 7:** Citotoxicidad de los sueros antes y después de ser absorbidos.

Para descartar posibles reducciones en la actividad citotóxica de los sueros debidas a algún grado de dilución inevitable durante el proceso de absorción, una fracción post-trasplante distinta del babuino D12 se concentró casi cinco veces sobre su volumen inicial. Primeramente la eficacia del procedimiento de concentración se corroboró sobre el suero no absorbido con el incremento de su citotoxicidad en 3,66 veces

respecto al mismo sin concentrar al evaluarse por ECH y de 2,93 veces cuando se hizo por CCCF (Figura 8). En la muestra absorbida la actividad citotóxica medida por ECH permaneció siendo nula tras la concentración del suero; por el contrario, la pequeña respuesta citotóxica encontrada por CCCF en el suero absorbido se incrementó aunque muy ligeramente (1,29 veces) después de su concentración. Estos datos confirmaron la profunda depleción de Acs citotóxicos hemolíticos en el suero independientemente del valor residual observado en CCCF y sorprendentemente solo un ligero incremento de la citotoxicidad estimada por CCCF de la muestra tras la absorción y concentración.



**Figura 8:** Citotoxicidad por ECH y CCCF tras la absorción y concentración de una muestra del suero (D12).

Abs: Sueros Absorbidos. Conc: Sueros Concentrados.

### **2.3 Presencia residual de xenoanticuerpos totales y de Acs específicos anti- $\alpha$ Gal en los sueros absorbidos.**

Para determinar el nivel de Acs de la clase IgG ó IgM totales anti-porcinos presentes en los sueros, absorbidos y no absorbidos, de los 4 babuinos elegidos se obtuvieron las MIF correspondientes a cada clase de Ig en ensayos de IFI frente a PBL de cerdo.

Los resultados indicaron que la cantidad de IgM e IgG anti-PBL porcino se redujo en todas las muestras después de las absorciones tanto en los sueros pre-trasplante como en los RXHA de los 4 babuinos analizados. En periodo pre-trasplante el valor de la mediana de los valores MIF de la IgM inicial fue de 90,75 y tras la absorción de 5,39 (Tabla IVa), esta última cifra representó por tanto solo el 5,94% del total IgM antes del proceso de absorción. En el momento del RXHA, el valor de la mediana de IgM pre-absorción fue de 157,57 y tras la absorción de 26,73 MIF, siendo en este caso el porcentaje residual detectado del 16,96% del valor inicial. Por tanto la IgM residual se incrementó en un 11,02% entre antes del trasplante y el momento de la necrosis en los sueros absorbidos.

Un análisis similar se realizó para la IgG (Tabla IVb), pero debido a que los valores tras la absorción de las muestras fueron muy bajos los resultados no fueron analizados.



Sueros	IgM			
	Pre-trasplante		RXHA	
	No Absorbidos	Absorbidos	No Absorbidos	Absorbidos
B32	129,43	15,40	136,19	21,45
B43	180,10	7,10	178,96	23,44
C68	52,08	3,69	64,03	30,02
D12	15,95	1,28	202,32	48,59
<b>mediana</b>	<b>90,75</b>	<b>5,39</b>	<b>157,57</b>	<b>26,73</b>
<b>rango</b>	<b>164,15</b>	<b>14,12</b>	<b>138,29</b>	<b>26,70</b>

**Tabla IVa:** Valores MIF de xenoanticuerpos totales clase IgM, detectados por inmunofluorescencia en los cuatro sueros seleccionados para absorción.

Sueros	IgG			
	Pre-trasplante		RXHA	
	No Absorbidos	Absorbidos	No Absorbidos	Absorbidos
B32	133,29	18,75	60,06	6,40
B43	23,76	3,70	21,88	4,40
C68	42,7	2,26	11,63	6,52
D12	76,74	2,46	18,37	8,04
<b>mediana</b>	<b>59,72</b>	<b>3,08</b>	<b>20,12</b>	<b>6,45</b>
<b>rango</b>	<b>109,53</b>	<b>16,49</b>	<b>48,43</b>	<b>3,64</b>

**Tabla IVb:** Valores MIF de xenoanticuerpos totales de clase IgG, detectados por inmunofluorescencia en los cuatro sueros seleccionados para absorción.

Paralelamente se realizó por ELISA un análisis similar para determinar la cantidad de Acs IgM o IgG específicos anti- $\alpha$ Gal específicos en los sueros de los 4 babuinos. Los resultados mostraron una reducción de los valores de Acs anti- $\alpha$ Gal tras la absorción con los hematíes porcinos en todas las muestras y en ambos momentos, pre-trasplante y RXHA (Tabla Va y b).

Los porcentajes residuales calculados para Acs IgM anti- $\alpha$ Gal fueron pequeños pero claramente distinguibles, pasaron de 12,46% en periodo pre-trasplante a 15,70% en RXHA (Tabla Va), obteniéndose un ligero incremento del 3,24%.

Los valores de IgG anti- $\alpha$ Gal de forma similar a lo ocurrido con el estudio IFI, fueron igualmente bajos, (1,92% pre-trasplante y 3,27% en RXHA) (Tabla Vb) con lo que se consideró no analizables para este tipo de ensayo.

Todos estos resultados en conjunto apuntaron primer lugar a la existencia de un valor residual IgM pre-trasplante pequeño que se incrementó en el momento RXHA hasta cerca del 17% en el suero de estos babuinos. Además, existe una participación relativamente importante de especificidades anti- $\alpha$ Gal en ambos momentos de la estimación y es menos variable que el incremento reflejado por la cantidad de xenoanticuerpos totales en el momento RXHA. La presencia de IgG no fue considerable en cualquier etapa post-absorción.

Sueros	IgM			
	Pre-trasplante		RXHA	
	No Absorbidos	Absorbidos	No Absorbidos	Absorbidos
B32	794	159	823	113
B43	1034	95	724	90
C68	909	118	149	52
D12	495	49	207	56
<b>mediana</b>	<b>851</b>	<b>106</b>	<b>465</b>	<b>73</b>
<b>rango</b>	<b>539</b>	<b>110</b>	<b>674</b>	<b>61</b>

**Tabla Va:** Valores de Acs IgM anti- $\alpha$ Gal específicos detectados por ELISA en los cuatro sueros seleccionados para absorción.

Sueros	IgG			
	Pre-trasplante		RXHA	
	No Absorbidos	Absorbidos	No Absorbidos	Absorbidos
B32	1143	7	955	3
B43	292	14	112	8
C68	388	16	15	6
D12	655	2	133	1
<b>mediana</b>	<b>521</b>	<b>10</b>	<b>122</b>	<b>4</b>
<b>rango</b>	<b>851</b>	<b>14</b>	<b>940</b>	<b>7</b>

**Tabla Vb:** Valores de Acs IgG anti- $\alpha$ Gal específicos detectados por ELISA en los cuatro sueros seleccionados para absorción.

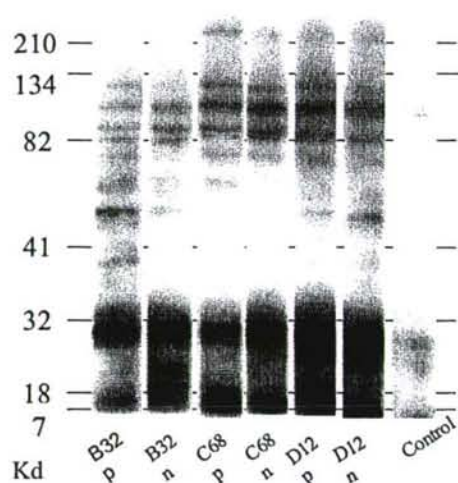


#### **2.4. Identificación de los xenoantígenos reconocidos por los xenoanticuerpos de babuinos mediante estudios de inmunoprecipitación y WB.**

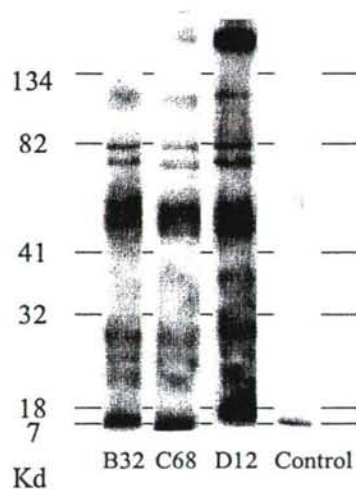
Para tratar de identificar molecularmente los posibles antígenos reconocidos por los xenoanticuerpos de los babuinos, se escogieron tres de las muestras con valores más altos en el análisis CCCF frente a EHC y que además tenían una importante capacidad para producir citotoxicidad remanente en CCCF tras la absorción, y se utilizaron para la inmunoprecipitación de las proteínas de los lisados celulares de PBL ó hematíes de cerdos marcados con biotina, que posteriormente fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida y analizados por la presencia de bandas en WB tras la incubación con un Ac secundario anti-IgM.

El estudio de los WB mostró un número variable, pero no excesivo, de bandas entre 7 y 210 Kd aproximadamente en las radiografías reveladas utilizando ambos tipos de lisados. Los resultados con los lisados de PBL porcinos marcados mostraron una similitud en la distribución de las bandas tanto entre los distintos sueros de babuinos como en ambos tipos de muestras, (pre-trasplante y en el momento RXHA) (Figura 9a), lo que parecía sugerir la no existencia de nuevos Acs inducidos de clase IgM.

Cuando comparamos el patrón de bandas desarrollado con los lisados de PBL y los obtenidos con hematíes (Figura 9b) encontramos que ambos son completamente distintos en el número y distribución de las bandas. La presencia de bandas entre 7 y 135 Kd confirma el reconocimiento de estructuras antigénicas sobre los lisados de hematíes porcinos e indica la existencia de xenoanticuerpos que no fueron detectados en EHC (Figura 9b). El mayor número de estas bandas en los WB realizados contra PBL sugiere mayores potencialidades antigénicas pero no descarta la existencia de antígenos compartiéndose entre ambas células, quizás, con diferente grado de expresión cuantitativa.



**Figura 9a:** Xenoreactividad sobre PBL de las IgMs presentes en los sueros absorbidos de los monos. Evidencia de una respuesta contra varios epitopes sin cambios apreciables entre los momentos pre-trasplante (p) y RXHA (n).



**Figura 9b:** Presencia de IgM xenoreactiva residual en sueros RXHA reconociendo diferentes estructuras en lisados de hematíes. Lo que confirma la existencia de varios Acs no detectados en EHC.

### **3. Capacidad protectora de la molécula hDAF, expresada en células de cerdos transgénicos, sobre la citotoxicidad de los sueros de primates.**

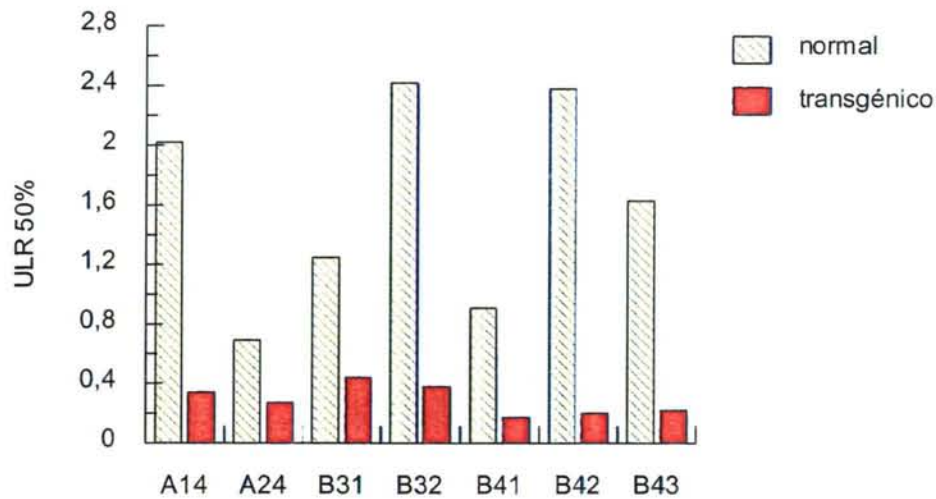
Para investigar el posible efecto protector de la presencia del transgén hDAF en la citotoxicidad humoral frente a órganos de cerdos, se analizó comparativamente la acción citotóxica de sueros de un grupo de 7 babuinos, seleccionando de cada uno una muestra pre-trasplante y otra post-trasplante, y comparando su efecto sobre células del cerdo control y del cerdo transgénico C751 utilizando para ello los métodos EHC y CCCF (exógeno o endógeno)

#### **3.1. Protección de la molécula hDAF expresada en un cerdo transgénico, frente a la citotoxicidad producida por el grupo de sueros de babuinos pre-trasplante**

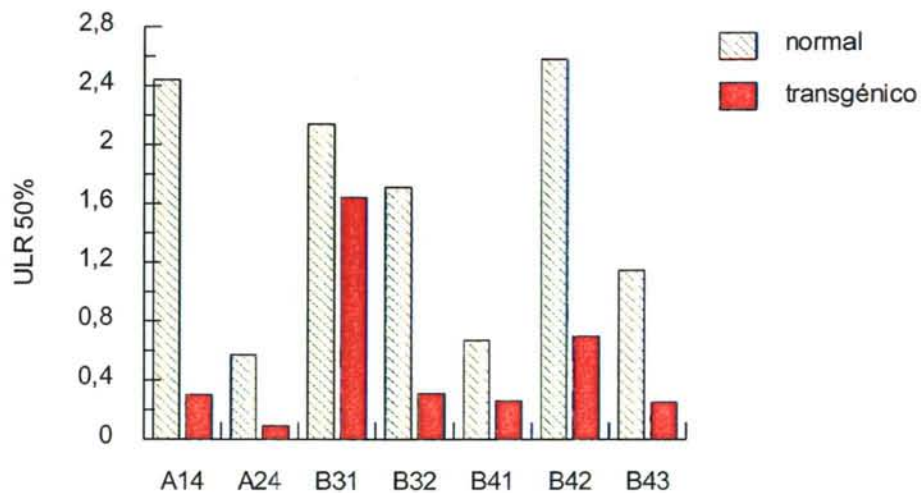
La exposición “in vitro” de las células del cerdo transgénico C751 y del cerdo control normal frente al grupo de los 7 sueros de los babuinos en el momento pre-trasplante demostró que la citotoxicidad sobre las células del animal transgénico era menor con todos los sueros y en los distintos ensayos citotóxicos realizados lo que indicaba claramente un papel protector debido a la presencia del transgén.

En EHC (pese a la variabilidad observada en el grado de citotoxicidad entre los distintos sueros) la mediana disminuyó desde 1,63 (rango 0,69-2,42) ULR sobre hematíes de cerdos normales hasta 0,27 (0,17-0,44) ULR sobre los del transgénico (Figura 10a). Resultados parecidos se obtuvieron al examinar las mismas muestras por CCCF exógeno (Figura 10b), aunque la muestra B31 fue ligeramente diferente, la mediana de la citotoxicidad medida frente a PBL disminuyó de 1,71 (0,57-2,58) en los cerdos normales a 0,30 (0,09-1,64) ULR en las células transgénicas. La reducción de la citotoxicidad cuando se utilizó el método CCCF endógeno con estos sueros (Figura 10c) pasó de una mediana de 1,00 (0,5-1,73) en los PBL del cerdo normal a 0,156 (0,00-0,47) ULR en los transgénicos. Incluyendo dos muestras (A14 y B43) en la que la actividad citotóxica detectada por este método fue nula.

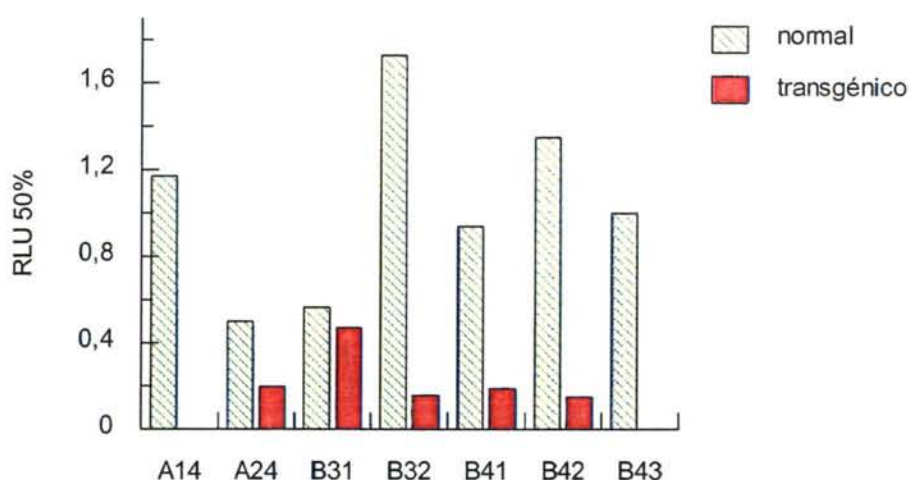




**Figura 10a:** Citotoxicidad de sueros de babuinos pre-trasplante detectada por EHC sobre hematíes del cerdo normal frente a los transgénicos del cerdo C751.



**Gráfico 10b:** Citotoxicidad de sueros de babuinos pre-trasplantes detectada por CCCF exógeno sobre PBL del cerdo normal frente los del cerdo transgénico C751.



**Figura 10c:** Citotoxicidad de sueros de babuinos pre-trasplantes detectada por CCCF endógeno sobre PBL del cerdo normal frente a los del cerdo transgénico C751.

En todos los casos, las diferencias entre los valores obtenidos al utilizar células normales o transgénicas fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,001$  Kruskal-Wallis). En conjunto la presencia del transgén fue equivalente a reducir la citotoxicidad promedio en un 83,43% según el método ECH, en 82,46% cuando se usó el método CCCF exógeno, y en 84,4% si fue el CCCF endógeno. Por tanto podemos concluir que la coincidencia de los resultados en los tres métodos permite afirmar que las células del cerdo C751 estaban protegidas hasta algo más del 80% como promedio con respecto a las del cerdo control frente a estas muestras de suero pre-trasplante.

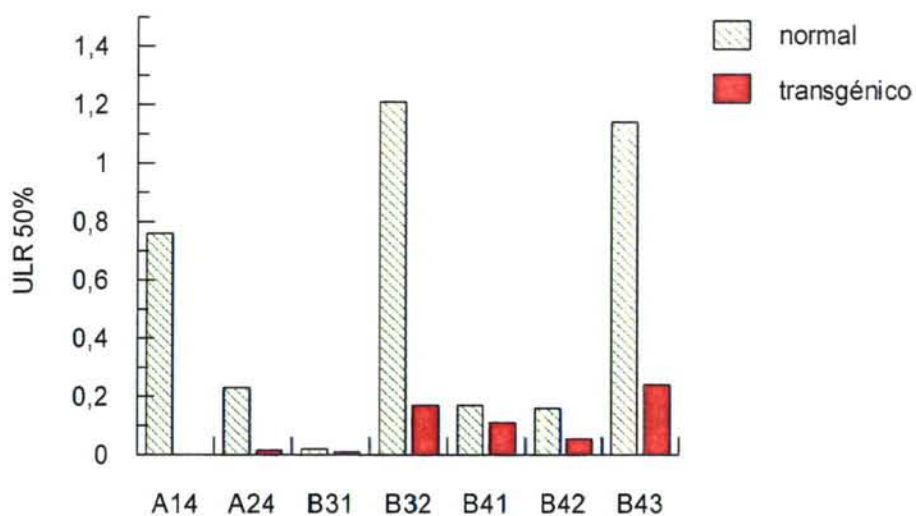
### 3.2. Protección de la molécula hDAF expresada en un cerdo transgénico frente a la citotoxicidad producida por diferentes sueros de babuinos post-trasplante.

Realizamos un análisis similar para estudiar el efecto producido por el transgén sobre los sueros de los mismos animales tras el trasplante. Los resultados fueron similares al grupo pre-trasplante, las células porcinas del cerdo transgénico expuestas a sueros de babuinos trasplantados con corazones de cerdos hDAF mostraron una significativa reducción del daño citotóxico sufrido en comparación a las células porcinas normales.

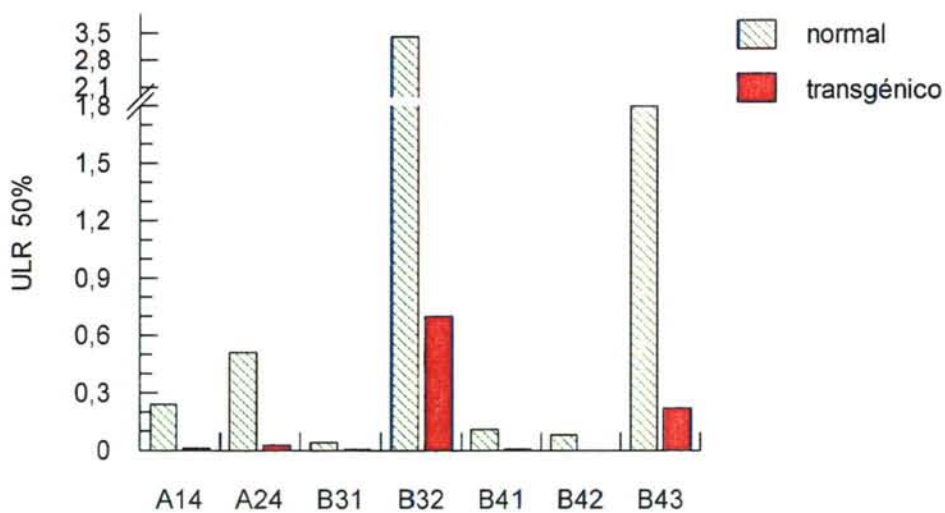
El análisis comparativo por EHC mostró disminución en todas las muestras (Figura 11 a) incluyendo la eliminación total de la actividad en dos de ellas, A14 y B31 frente a las células del cerdo transgénico. La mediana de la citotoxicidad 0,17 (0,02-1,21) ULR detectada frente a células normales disminuyó a 0,05 (0,00-0,24) ULR cuando se ensayó con las transgénicas. El análisis por CCCF exógeno (Figura 11b) de igual modo mostró disminución de la citotoxicidad en todos los sueros. En este caso además de las muestras A14 y B431 otras dos, B41 y B42, no tuvieron citotoxicidad alguna frente a los PBL transgénicos. La mediana frente a PBL controles de 0,24 (0,04-3,41) ULR disminuyó a 0,01 (0,00-0,70) ULR con los transgénicos siendo estas diferencias muy cercanas a la significación estadística ( $p=0,056$  Kruskal- Wallis). El análisis con CCCF endógeno no se realizó debido a que la mayoría de los valores fueron insignificantes probablemente por efectos de los tratamientos. La presencia del transgén fue equivalente a reducir la citotoxicidad máxima promedio en un 68,23% según ECH y en 95,83% según CCCF exógeno. Esta vez, hubo cierta diferencia entre ambos métodos por separado, pero en conjunto el papel protector del transgén en las células expuestas a sueros de babuinos tras el trasplante logró el 82,03% de reducción de la citotoxicidad.

Estos resultados sugieren un importante papel protector para las células que expresan la molécula hDAF en su superficie, aunque probablemente con alguna diferencia en periodos post-trasplante cuando se usan las distintas dianas en los distintos métodos, hecho que pudiera estar relacionado con los resultados señalados en el apartado anterior **“Xenoanticuerpos dirigidos a epitopes expresados en células nucleadas ausentes en hematíes”**





**Figura 11a:** Citotoxicidad de sueros de babuinos trasplantados detectada por EHC sobre hematíes normales frente a los transgénicos.



**Figura 11b:** Citotoxicidad de sueros de babuinos trasplantados detectada por CCCF exógeno sobre PBL normales frente a los transgénicos.

### 3.3. Correlación entre la protección frente al daño citotóxico, aportada por la presencia del transgén hDAF, y la existencia de Acs específicos anti- $\alpha$ Gal en los sueros de los babuinos.

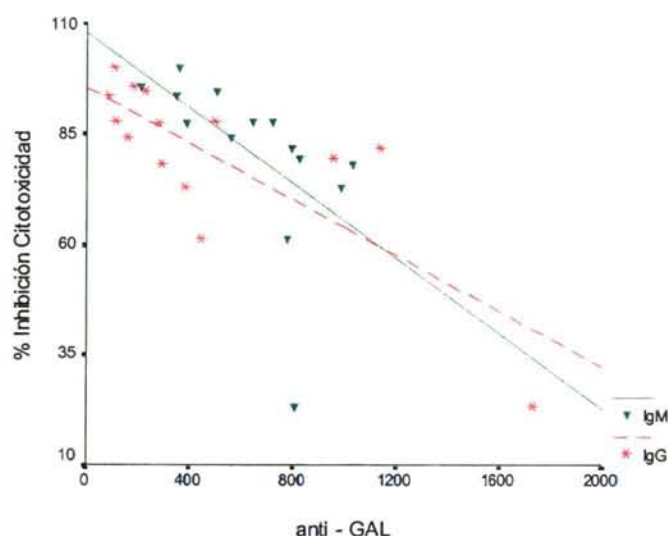
Para determinar si el grado de citotoxicidad que las muestras generan sobre las células transgénicas estaba en relación con el título de Acs anti- $\alpha$ Gal de los sueros ensayados, se calcularon los porcentajes de inhibición experimentado por cada suero de bábino probado en las células transgénicas estableciendo como el 100% el daño obtenido frente a las del cerdo control y se correlacionaron estas medidas con los títulos de Acs anti- $\alpha$ Gal determinados por ELISA.

La medición de los Acs anti- $\alpha$ Gal en los sueros de los 7 babuinos mostró concentraciones variables y relativamente altas de IgG e IgM. El grupo de 7 muestras pre-trasplante presentó valores de IgG de mediana 448 (160-1730) y de IgM 794 (560-1034) que fueron mas altas que las obtenidas con los sueros del grupo de RXHA con medianas de 186 (86-955) para la IgG y 392 (211-1034) para la IgM.

Los porcentajes de inhibición citotóxica estudiados por CCCF exógeno (porcentaje citotóxico del transgénico respecto al hallado sobre el cerdo control), se correlacionaron con los valores de ambas clases de inmunoglobulinas IgG e IgM anti- $\alpha$ Gal medidos por ELISA (Figura 12). La correlación entre estos porcentajes de inhibición y los xenoanticuerpos mostraron coeficientes de asociaciones negativos:  $-0,736$  para la IgG y  $-0,833$  para la IgM; con  $p < 0,001$   $n=14$  (Rho Spearman) para ambas correlaciones. Lo que significa que a mayor cantidad de Acs anti- $\alpha$ Gal menor inhibición de la citotoxicidad lograda frente a las células transgénicas.

Esta correlación no pudo obtenerse de forma estadísticamente significativa cuando la citotoxicidad fue medida por los métodos CCCF endógeno o con EHC, aunque existiese una tendencia a la asociación entre el incremento del título de Acs anti- $\alpha$ Gal en los sueros y la disminución en el grado de inhibición de la citotoxicidad. Tampoco fue posible demostrar la asociación con las muestras de sueros divididas en los grupos

pre-trasplante y en el momento post-trasplante, con excepción de la IgM, en la que el porcentaje de inhibición obtenido por CCCF exógeno estuvo correlacionado con la concentración de Acs  $\alpha$ Gal en el momento post-trasplante ( $Rho -679$   $p=0,047$   $n=7$ ).



**Figura 12:** Correlación entre el porcentaje de inhibición de la citotoxicidad de los sueros babuinos (CCCF exógeno) y los títulos de Acs anti  $\alpha$ GAL (ELISA).

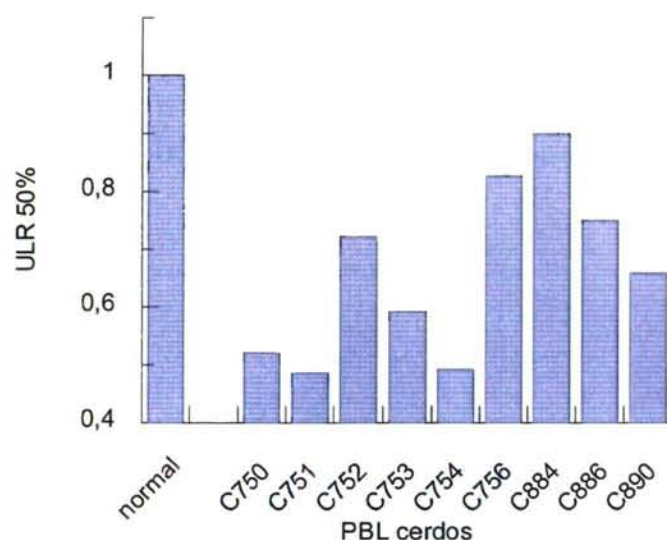
### 3.4. Variabilidad en el grado de protección conferida por el transgén hDAF en distintos cerdos frente a la actividad citotóxica de los sueros de primates.

Para explorar la posible variabilidad en la capacidad de protección inducida por la molécula hDAF entre distintos cerdos transgénicos, se comparó la capacidad citotóxica del SHN frente a células de 9 cerdos transgénicos.

La evaluación por CCCF exógeno del SHN sobre las diferentes células transgénicas comparando los resultados con los obtenidos cuando se usaban PBL de un cerdo control normal volvió a demostrar una reducción de la actividad citotóxica si el transgén está presente (Figura 13). Los porcentajes de inhibición de la citotoxicidad para cada una de las distintas muestras de PBL trasgénicos respecto al 100% obtenido

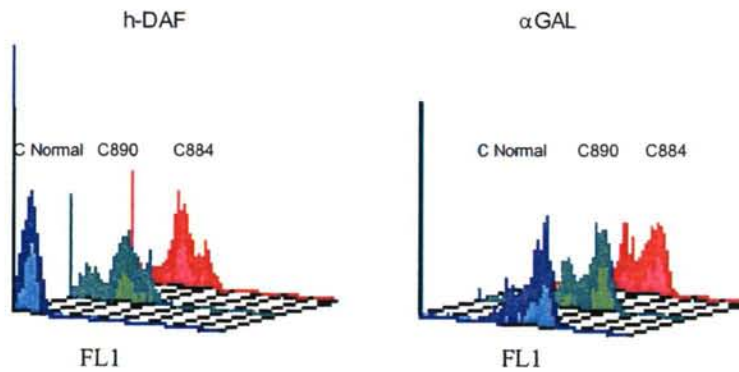


sobre el PBL normal fueron: un 47,93% para C750; un 51,50% para C751; un 27,78% para C752; un 39,39% para C753; un 50,74% para C754; un 17,26% para C756; un 10,00% para C884; y un 25,00% para C888; y por último un 34,1% para las células del cerdo C890.

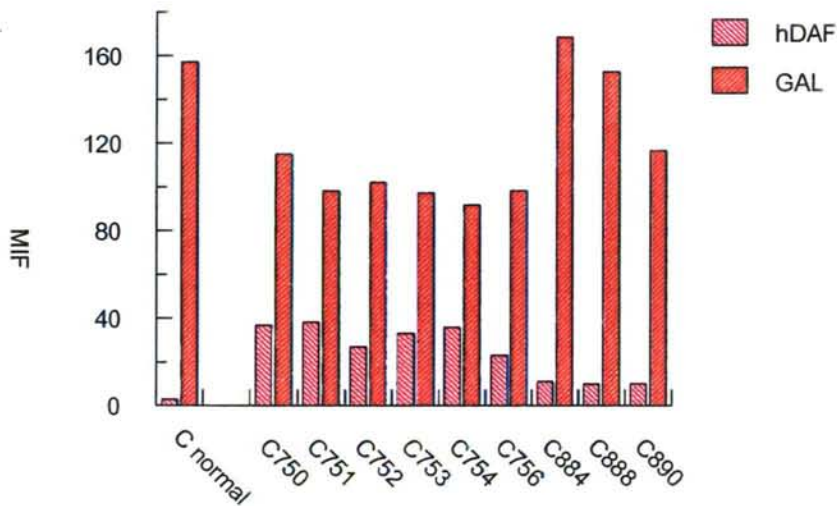


**Figura 13:** Variación en el grado de citotoxicidad de una muestra de SHN frente a PBLs de distintos cerdos transgénicos por CCCF exógeno.

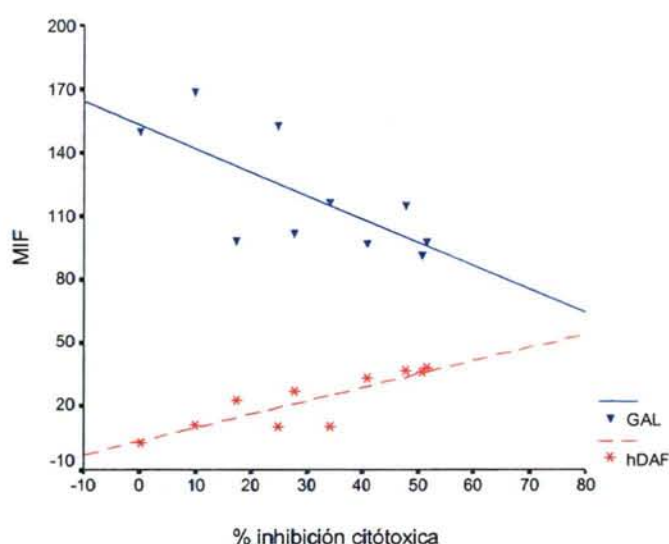
Para tratar de explicar las diferencias observadas en el grado de protección de los distintos cerdos transgénicos se determinó la expresión de las moléculas hDAF y de los antígenos  $\alpha$ Gal en la superficie de los PBLs correspondiente mediante inmunofluorescencia. En el grupo de cerdos estudiados la variabilidad entre los porcentajes en la expresión de estas dos moléculas entre los 9 animales (Figura 14) fue relativamente pequeña en comparación con los porcentajes de citotoxicidad CCCF, no obstante, usando el valor MIF del análisis citométrico de cada animal (Figura 15), y comparando en cada caso este con el grado de inhibición en la actividad citotóxica, esta se correlacionó positivamente con el aumento de MIF para la molécula hDAF (Rho Spearman 0,855  $p=0,001$   $n=10$ ) y negativamente con la expresión de antígenos  $\alpha$ Gal (Rho Spearman -0,709  $p=0,011$   $n=10$ ) (Gráfico 16)



**Figura 14:** Variación en la expresión de las moléculas h-DAF y  $\alpha$ Gal de los PBL porcinos por citometría de flujo. (Se muestran como ejemplo datos de animales que mostraron diferencias sustanciales)



**Figura 15:** Variación en las MIF de las moléculas hDAF y  $\alpha$ Gal de los PBL porcinos. Las diferencias son más notables cuando se usa esta medida.



**Figura 16:** Correlación entre la expresión de moléculas hDAF ó  $\alpha$ GAL con el grado de inhibición citotóxica en PBL de cerdos por CCCF exógeno. Ambas moléculas mostraron alta correlación con la actividad funcional.

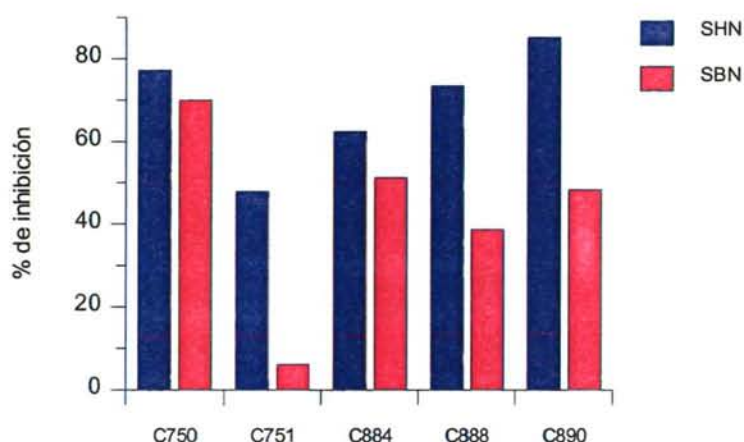
Estos resultados confirman el papel protector del transgén sobre la citotoxicidad dependiente del complemento de los cerdos hDAF transgénicos, pero indican que el grado de protección es variable frente a una misma muestra de suero humano y ello puede estar a la vez relacionado con la expresión de las moléculas hDAF y/o  $\alpha$ Gal sobre dichas células.

### 3.5. Influencia del grado de homología de especie entre el complemento y la molécula protectora DAF en la medida de la citotoxicidad humoral.

En el ensayo anterior (CCCF exógeno) la variabilidad en el grado de protección entre las distintas células transgénicas quedó demostrada utilizando una fuente de complemento proveniente de conejo, por tanto se podría plantear la duda de que al ser el complemento de una especie distinta este no actúe correctamente en su relación con la molécula transgénica DAF humana presente en los cerdos.



Para evaluar la inhibición de la citotoxicidad en condiciones de mayor grado de homología se comparó la citotoxicidad obtenida frente a las células de 5 animales transgénicos mediante ensayos CCCF endógeno con las muestras de SHN (homologo de especie al transgén) y de SBN. Los resultados de estos experimentos mostraron una protección ligeramente superior frente al SHN en comparación con el SBN en todas las muestras de PBL transgénicos analizados (Figura 17). El valor de la mediana de citotoxicidad con SHN fue de 0,265 (0,149-0,522) frente a 0,517 (0,30-0,84) ULR 50% de los SBN. Estos datos indicaron cierta influencia del grado de homología inter-especies para la protección de las moléculas participantes en el mecanismo citotóxico.

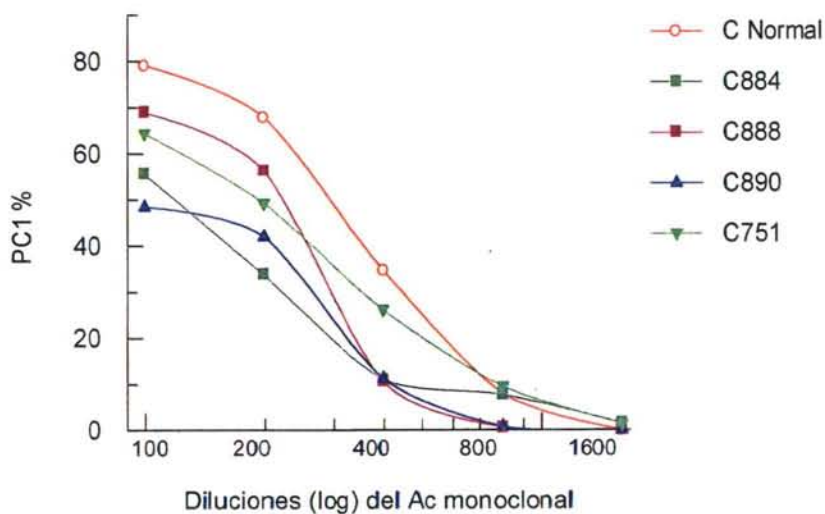


**Figura 17:** Porcentajes de inhibición en el grado de citotoxicidad de las muestras de SHN y SBN en CCCF endógeno frente a PBLs de distintos cerdos transgénicos.

Con este número de muestras (n=6) la correlación entre el grado de inhibición de la citotoxicidad y la expresión de hDAF no pudo ser demostrada estadísticamente, ni con el SHN, ni con el SBN, en ensayos CCCF endógenos a pesar de mostrar una tendencia manifiesta.

Para analizar el efecto de la molécula hDAF sobre la citotoxicidad de complemento de manera objetiva e independiente de la presencia de los Acs anti- $\alpha$ Gal, se realizó un análisis a través de ensayos CCCF exógeno, en los que se aplicaron concentraciones

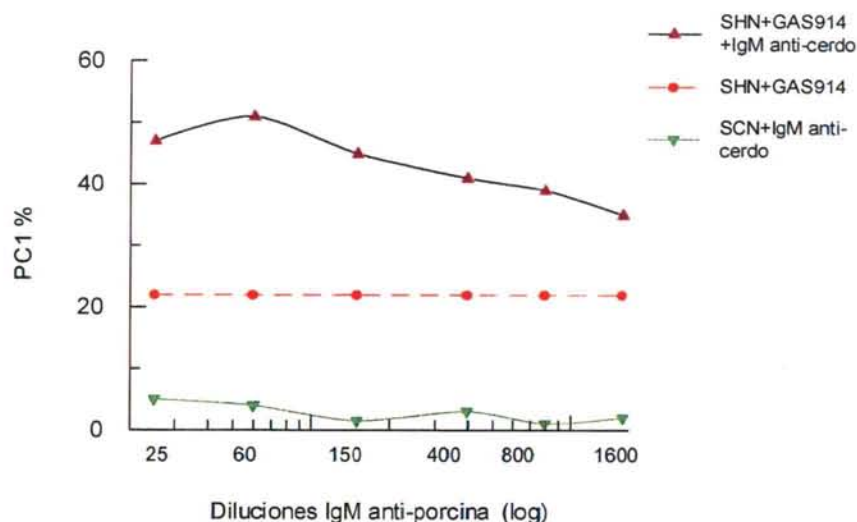
seriadas de un Ac monoclonal IgM anti-porcino (0,125-0,008  $\mu\text{g/ml}$ ) en lugar de sueros y se evaluó la acción del complemento de conejo. El grado de citotoxicidad detectado por este sistema sobre PBL transgénicos disminuyó respecto la citotoxicidad frente a las células normales en un 38,70%. La mediana ULR para el grupo de 4 muestras fue de 0,613 ULR (0,500-0,800) (Figura 18).



**Figura 18:** Inhibición de la citotoxicidad inducida por IgM monoclonal murina anti-porcina más complemento de conejo (CCCF exógeno).

Además con este sistema pudimos comprobar el nivel de protección de las moléculas autólogas DAF porcinas (entre otras reguladores del complemento) sobre el propio complemento del receptor. Para ello se enfrentaron PBL de cerdos normales a diluciones de la IgM monoclonal anti-porcina más complemento homólogo (contenido en el suero porcino). La presencia del complemento homólogo no produjo citotoxicidad con la IgM monoclonal murina, ni aún a concentraciones 12 veces mayores (1,56  $\mu\text{g/ml}$ ) que las usadas en el experimento anterior (Figura 19). Mientras el SHN, inhibido con GAS 914 (para evitar en lo posible el efecto dependiente de los Acs anti- $\alpha\text{Gal}$ ), produjo una citotoxicidad dosis dependiente evaluable desde 0,25  $\mu\text{g/ml}$  hasta aproximadamente 0,007  $\mu\text{g/ml}$ , dilución a partir de la cual, la citotoxicidad mediada por la IgM anti-porcina, se une a la residual dependiente de los

Acs contenidos en SHN. El resultado indicó que el nivel de protección aportado por las moléculas propias de los cerdos normales es total respecto a la que brinda el transgén hDAF para la activación del complemento.



**Figura 19:** Citotoxicidad inducida por IgM anti-porcina con SHN y SCN ambos sobre PBL de cerdo normal. La línea de puntos marca el máximo de inhibición logrado para el SHN en presencia constante de GAS 914 (6mg/ml).

Conjuntamente todos los resultados confirman la capacidad protectora de la presencia de molécula hDAF en células de los cerdos transgénicos frente a diferentes tipos de sueros de primates “in vitro” y al mismo tiempo refuerzan la importancia de que exista un grado de homología entre las especies a las que pertenecen las moléculas implicadas en la protección frente al daño citotóxico humoral en procedimientos de este tipo.



## ***DISCUSIÓN***

## **V. DISCUSIÓN**

El uso de órganos procedentes de otras especies como una posible solución a la demanda de órganos para los trasplantes en humanos ha dado lugar a un intenso trabajo de investigación en el campo del xenotrasplante. La necesidad de establecer modelos prácticos en los que las especies seleccionadas se aproximen anatómica y funcionalmente a los humanos, incluyendo una cierta similitud molecular para el estudio de reacciones inmunes del supuesto hombre trasplantado, ha convertido al modelo cerdo / primate en la opción más utilizada en estos estudios. En las respuestas de rechazo que se producen con este tipo de modelo la prioridad la mantienen hasta el momento, los fenómenos de índole humoral. La citotoxicidad mediada por Acs y el complemento es un componente inevitable en el estudio de respuestas humorales. En este trabajo se aborda primeramente la puesta a punto y utilización de un método de laboratorio adecuado y eficaz para la investigación de funciones citotóxicas en modelos de xenotrasplante y posteriormente este método se aplica al estudio de Acs citotóxicos y a la protección frente a la citotoxicidad mediada por el complemento en modelos cerdo / primates “*in vitro*”.

### **1. Validez del método de detección de la citotoxicidad humoral por CCCF.**

La cuantificación funcional de la citotoxicidad humoral es esencial para el desarrollo de los estudios experimentales y de los ensayos terapéuticos en el campo del xenotrasplante siendo su objetivo primordial estudiar o evaluar el seguimiento de las respuestas inmunológicas de la mejor manera posible. Los análisis de la viabilidad celular por citometría de flujo por tinción única o doble (Daf / IP) son métodos de lectura objetiva ampliamente utilizados en biomedicina, que se presentan como opciones interesantes para su aplicación en la evaluación de la citotoxicidad en las muestras de sueros de los animales receptores.

Utilizando CCCF, al enfrentar las diluciones de las muestras de suero frente a una cantidad fija de células dianas en las condiciones adecuadas y según el tipo de ensayo, se obtuvieron curvas indicativas de daño celular en función del poder citotóxico de los sueros analizados, factibles de ser utilizadas en un método de laboratorio para la exploración de la citotoxicidad. Algunas de las características más relevantes de los resultados obtenidos con éstas curvas en el presente estudio fueron:

- Expresan relativa baja linealidad común en varios procesos biológicos<sup>122,129,131</sup>.
- Menor intensidad en la citotoxicidad explorada por la vía endógena.
- Alto grado de correlación entre las dos formas del método independientemente de las diferencias en el poder de los ensayos CCCF endógenos o exógenos.
- Alta coincidencia entre las dos formas de marcaje IP o Daf en la curva, que es extensible al cálculo de ULS.

En las muestras de sueros pre-trasplante, en las que las funciones del complemento endógeno no estaban alteradas por ningún tratamiento, se obtuvo una correlación entre las vías endógenas y exógenas independientemente del tipo de PC calculados y de la sensibilidad lograda con cada forma del método. Esto significa que en ausencia de factores que modifiquen la capacidad del complemento en los sueros, la citotoxicidad medida por CCCF endógeno sobre poblaciones celulares es una función que cursa paralela a la de CCCF exógeno, y consecuentemente los resultados encontrados en una de las formas del método son en buena medida equivalente a la otra. En el presente estudio, la diferencia fundamental a la hora de aplicar cada una de estas vías a los distintos ensayos se basó en el uso preferente de **CCCF exógeno para la medición funcional de los Acs citotóxicos** presentes en el suero mientras que **CCCF endógeno se destinó para el estudio funcional del complemento**, en particular de la citotoxicidad humoral en conjunto, es decir, **Acs más complemento**.

No obstante aunque ambas vías son validas para el estudio de Acs citotóxicos, la elección del uso de CCCF vía complemento exógeno se debe, en parte, al incremento en la sensibilidad del método para detectar Acs inductores de citotoxicidad con la



administración de complemento exógeno. Este hecho fue debido probablemente a varios factores:

- La concentración que se puede usar en el ensayo CCCF exógeno es mayor que la del complemento contenido en las muestras para el ensayo CCCF endógeno.
- Se logra mejor estabilidad del complemento con su conservación en la forma liofilizada que es la utilizada en CCCF exógeno.
- La temperatura de incubación para los Acs primarios (muestras de sueros) en el CCCF exógeno (4°C) es menor que la usada en CCCF endógeno (37°C). Esto sucede para favorecer la acción del complemento que se realiza conjuntamente sobre los Acs contenidos en las muestras (CCCF endógeno). Existe una fuerte dependencia entre la temperatura y la unión de los xenoanticuerpos naturales con las células dianas siendo óptima 2°C<sup>36</sup>
- Las curvas de citotoxicidad obtenidas por el método CCCF exógeno muestran una caída más suave que las obtenidas por el CCCF endógeno, esto se debe a que con la dilución de los sueros a lo largo de la placa disminuye la concentración de Acs citotóxicos, y por tanto se diluye inevitablemente también, la del complemento en el ensayo CCCF endógeno. Esto no ocurre en CCCF exógeno donde la disminución de la citotoxicidad está básicamente en función de la dilución de Acs y el complemento es añadido de forma constante en todos los pocillos.

Atendiendo a las curvas de citotoxicidad obtenidas con PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub>, no se distinguen ventajas entre utilizar resultados obtenidos por el marcaje con IP o Daf. En términos de ULS, el marcaje con IP ofrece resultados apenas mejores a los obtenidos con Daf atendiendo a la exactitud en el cálculo de las ULS (menos dispersión en ES). En todo caso, el valor medio de las ULS calculadas y las correlaciones obtenidas con los distintos porcentajes de citotoxicidad en las muestras de animales pre-trasplante o pos-trasplantados no difirieron sustancialmente en este estudio. Aunque no es imprescindible el uso de doble marcaje en los estudios de viabilidad, Loken et al<sup>115</sup> han señalado que la introducción de artefactos, como son agregados y dobletes, en el análisis citométrico de células teñidas por inmunofluorescencia pueden ser

importantes. En este sentido resulta interesante señalar que el uso del doble marcaje permitió mejor la exclusión del fondo de inespecificidad, y que cuando este aumenta, particularmente en controles de la muerte espontánea, se incrementa notablemente la diferencia entre las mediciones obtenidas por IP ó Daf.

El empleo de modelos matemáticos sigue siendo un método ventajoso para reducir a un solo número la expresión de un grupo de cifras obtenidos en las curvas de respuestas citotóxicas, manejando y comparando valores que escapan a los análisis gráficos descriptivos. La idoneidad del modelo representativo escogido está en relación con la naturaleza del proceso biológico a describir en cada caso<sup>129,131</sup>. En este estudio, aunque todos los modelos contrastados lograron un ajuste estadísticamente significativo, el empleo de las diferentes ecuaciones matemáticas tuvo alguna influencia en los resultados obtenidos. De ellos, la ecuación de VK ajustada por un método iterativo ofreció los mejores resultados respecto al resto de los modelos matemáticos comparados.

Dada la relativa facilidad en el procedimiento de cálculo de la ecuación VK en su forma lineal, este ha sido por mucho tiempo el modelo más utilizado en la determinación de ULS en estudios experimentales para medir la acción del complemento<sup>120,121</sup>. Sin embargo, los sistemas informáticos en los ordenadores actuales brindan la posibilidad de realizar cálculos iterativos de forma muy sencilla y rápida evitando que la complejidad matemática se convierta en un factor limitante para el análisis de este tipo de datos por estos procedimientos.

Los modelos matemáticos VK y EP presentan la ventaja de que son ecuaciones capaces de incorporar todos los puntos de una curva y no una porción arbitrariamente seleccionada de la misma como ocurre cuando se trabaja con la parte lineal de un análisis de regresión o cuando se intentan linealizar los datos<sup>129,132</sup>. En particular, EPE además tiene la ventaja de que cuando se establece una asíntota común en un grupo de experimentos de citotoxicidad celular, el valor de la citotoxicidad es independiente del porcentaje de lisis fijado, ya sea el 10%, 30%, o el 50%<sup>129,133</sup>. Esta característica es



importante en muestras con niveles de citotoxicidad bajos donde se deben estimar ULS a un porcentaje de citotoxicidad reducido y donde la selección de un porcentaje u otro implica variaciones en los resultados<sup>129,134</sup>.

Sin embargo, en este estudio se detectaron algunas diferencias de EPE respecto a los resultados encontrados con VK y EPI, estas diferencias están probablemente relacionadas con el valor de la "A" usada en los experimentos. La elección de la "A" para el modelo EPE tomando los valores de citotoxicidad máximos experimentalmente, no es siempre un procedimiento simple. En ensayos celulares la "A" puede diferir experimentalmente, pero debe ser un número característico de una población celular y por ello, las muestras evaluadas alcanzan un porcentaje máximo de lisis si se añaden más células efectoras a las dianas<sup>129</sup>. En los ensayos para medir la acción del complemento se logra este efecto (aproximarse al 100%), reduciendo las diluciones del suero problema (a veces en consecutivos experimentos), pero aún así en algunos casos esto ya no es posible por lo que se hacen estimaciones de ULS sobre porcentajes muy bajos o se extrapolan los valores incorrectamente fuera de los rangos permitidos en la ecuación.

La determinación de un valor citotóxico por AUC, un método usado con relativa frecuencia<sup>117,124</sup>, no pudo ser contrastado frente a VK y EP porque no necesitó ajustar una función matemática a los datos. Esta particularidad puede resultar atractiva frente a la complejidad de los otros modelos, pero en este trabajo los resultados obtenidos por AUC fueron los que menos se correlacionaron con el resto de los resultados, lo que sugiere un comportamiento algo distinto del resto de los modelos en la expresión de la actividad citotóxica.

Por CCCF, la sensibilidad encontrada al utilizar muestras pre-trasplante y post-trasplante fue equivalente al de otros métodos, como Cr<sup>51</sup> o EHC. CCCF fue capaz de detectar niveles de citotoxicidad en muestras entre 10-20 veces menores que los sueros que conservan su capacidad basal normal. La sensibilidad parece ser diferente para el tipo de célula diana empleada. La relación entre los niveles de citotoxicidad funcional



detectada por métodos cercanos al aquí utilizado y la expresión de moléculas antigénicas en la superficie como las  $\alpha$ Gal ya fue demostrada en células de origen epitelial<sup>119</sup>.

El método CCCF es eficaz para evaluar “in vitro” el efecto de posibles inhibidores de la citotoxicidad. El hecho de detectar solo un nivel de citotoxicidad próximo al 10% en los sueros neutralizados de Acs anti- $\alpha$ Gal por el GAS 914 confirma “in vitro” la capacidad de esta molécula para inhibir la citotoxicidad de sueros, lo que apoya la posibilidad de su empleo en tratamientos<sup>89</sup>. Sin embargo la falta de eliminación total de la citotoxicidad reflejada en este 10%, residual sugiere la presencia de un porcentaje de xenoanticuerpos con otras especificidades que pueden persistir y participar en los daños citotóxicos.

Por otra parte, se ha estudiado exhaustivamente la capacidad inhibitoria de las heparinas y otros dextranos sobre el complemento<sup>134-136</sup>. Las dosis relativamente bajas usadas en nuestros experimentos eliminaron la citotoxicidad de las muestras “in vitro” pero no parecen adecuados para tratamiento “in vivo” dado los potentes efectos anti-coagulantes comprobados con menores cantidades de este medicamento. La realización de los dos tipos de ensayos bajo condiciones de neutralización con GAS 914 o inhibición con heparina contribuyó a demostrar la sensibilidad funcional de la prueba “in vitro”.

En resumen el método puesto a punto para medir citotoxicidad humoral en nuestros modelos de xenotrasplantes, CCCF con doble marcaje IP/Daf expresando sus resultados como ULS presenta los requerimientos necesarios para considerarlo un ensayo útil en el estudio de la citotoxicidad del xenotrasplante. Además, muestra importantes ventajas relacionadas con el uso flexible de distintas dianas, habitualmente no empleadas, que identifican otros xenoanticuerpos en ensayos citotóxicos funcionales en otros métodos, y aporta la posibilidad además de poder analizar la acción del complemento propio de las muestras mediante pequeños ajustes de diseños.

## **2. Participación en la citotoxicidad humoral de xenoanticuerpos presentes en los sueros de los primates no detectados en los clásicos ensayos hemolíticos frente a hematíes porcinos.**

Hasta hoy, el papel preponderante de los Acs naturales dirigidos a epitopes  $\alpha$ Gal en los mecanismos que median la respuesta inmune al rechazo hiperagudo, y posiblemente en la inducción del RXHA del xenotrasplante, han constituido uno de los elementos más estudiados en relación con el rechazo en xenotrasplantes ya comentado en la introducción. Esto ha propiciado que se haya prestado menos atención a la posible participación de Acs con otras especificidades en el xenorechazo dejando su papel reducido a planos secundarios y a menudo cuestionables. Los estudios para demostrar la participación de Acs no-Gal se han limitado a un cúmulo de evidencias, mas o menos indirectas, realizadas sobre ensayos muy heterogéneos<sup>124,137-144</sup> y cuyos resultados hasta la fecha no definen una posición muy precisa. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos al analizar la capacidad citotóxica y la presencia de Acs residuales en algunas de las muestras procesadas también mostraron evidencias indirectas de la participación de otros Acs con especificidad no  $\alpha$ Gal.

La evaluación de una pequeña muestra de sueros de babuinos sometidos a xenotrasplantes demostró, en su conjunto, la disminución de su citotoxicidad media en el momento de RXHA respecto del nivel basal pre-trasplante, debida parcialmente al tratamiento inmunosupresor. Sin embargo, no ocurrió igual cuando se analizaron individualmente las distintas muestras de sueros, ya que en ese caso algunas aumentaron su nivel citotóxico. Tampoco las variaciones experimentadas por los sueros fueron proporcionales, sino que variaban según fuese el método elegido para su medición, CCCF o EHC. Las diferencias en la expresión cuantitativas o cualitativas de los antígenos entre las dianas empleadas en uno u otro método (PBL o hematíes) podrían explicar en parte estos resultados. Por ejemplo, es bien conocido que en el humano la presencia de algunas familias de antígenos de eritrocitos define la existencia de grupos sanguíneos cuyos epitopes no aparecen en células no



eritrocíticas<sup>145</sup>. De igual forma, otros antígenos como las moléculas HLA clase II que están presente en todas las APC son excluidas de otras series hematológicas incluyendo los hematíes adultos<sup>146</sup>.

Para analizar la hipótesis de que las diferencias en citotoxicidad tenían como origen las posibles diferencias antigénicas entre hematíes y PBL, los sueros de babuinos que habían resultado más dispares en el análisis comparativo de la citotoxicidad evaluada por ECH o CCCF, se absorbieron con hematíes porcinos con el objeto de eliminar todos los xenoanticuerpos con especificidades reconocidas en las membranas eritrocitarias presentes en el suero, quedando libres solo aquellos Acs que reconocían a antígenos que no se encontraban en los hematíes. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de un porcentaje de citotoxicidad residual, particularmente importante en el momento de RXHA (17,21%), lo que sugirió la presencia funcional en estos sueros de Acs dirigidos a epitopes presentes en PBL y ausentes en hematíes.

Cuando Platt y cols en 1990<sup>147</sup> realizaron estudios en WB con sueros humanos normales, enfrentándolos a distintos tipos de lisados celulares (hematíes, PBL, células endoteliales y plaquetas) sugirieron la idea de una distribución desigual de los antígenos reconocidos entre los distintos tipos de células, aún antes de que las moléculas  $\alpha$ Gal se distinguieran como los determinantes antigénicos principales del xenotrasplante<sup>30,148</sup>. Recientemente Buhler y cols en un estudio con cierto grado de similitud al nuestro encontró citotoxicidad residual de sueros de babuinos frente a células endoteliales porcinas después de eliminar Acs anti- $\alpha$ Gal<sup>139</sup>.

En estudios de seguimientos de trasplantes de cerdos a primates no humanos, los ensayos no funcionales de IFI que detectan por citometría IgM o IgG frente a células endoteliales de cultivos, o frente a PBL porcinos, han demostrado tener mayor sensibilidad para detectar el incremento o descensos de xenoanticuerpos, sobre todo en periodos post-trasplante, que otros métodos como son la hemaglutinación, ELISA anti- $\alpha$ Gal o ensayos hemolíticos<sup>124</sup>. Teóricamente esta mayor precisión podría estar asociada con la presencia de Acs no dirigidos a antígenos  $\alpha$ Gal, ó de Acs no



activadores del complemento o bien con la presencia Acs dirigidos contra antígenos ausentes de los hematíes. Ese mismo estudio al realizar correlaciones entre métodos con distintos fundamentos: a) IgM detectada en IFI contra células epiteliales b) IFI contra PBL, c) presencia de IgM anti-Gal en ELISA, y d) EHC, comprobó que se obtiene resultados equivalente en los sueros de los monos trasplantados no deplecionados de Acs anti- $\alpha$ Gal con estas evaluaciones. Sin embargo las correlaciones entre las dos clases de Acs IgM e IgG estudiados por IFI, y los valores obtenidos de los ELISA se perdían si se eliminaban por absorción los Acs anti- $\alpha$ Gal, mientras se mantenían las correlaciones entre IFI con PBL e IFI con células endoteliales tanto en IgM como en IgG, lo que para los autores sugería la presencia en los residuos de Acs no dirigidos a antígenos  $\alpha$ Gal de clase IgM e IgG.

En nuestro estudio, la caracterización por IFI de las muestras con actividad citotóxica no demostrable en EHC, tras su absorción con hematíes porcinos, reveló poblaciones de Acs residuales fundamentalmente de clase IgM con un promedio superior al 15% del total del suero no absorbido, encontrándose un incremento de la cantidad de Acs en RXHA en 11,02% respecto a los pre-trasplante.

Con lo analizado hasta aquí podemos considerar que:

- a) Pese al tratamiento realizado tras el trasplante, en los cuatro babuinos seleccionados para absorción existen Acs residuales detectados por IFI que tienen mayormente especificidad anti- $\alpha$ Gal demostrables por ELISA. El nivel de estos Acs se incrementa en el momento RXHA, donde son detectados funcionalmente por CCCF pero no por EHC. El incremento de IgM detectado por IFI en RXHA no conlleva aparejado un aumento similar de los títulos anti- $\alpha$ Gal lo que indica que una parte de estas IgM (menor cantidad) pueden ser no anti- $\alpha$ Gal.

El aumento en la presencia de Acs anti- $\alpha$ Gal en los días posteriores al xenotrasplante con órganos porcinos fue demostrado en otros estudios con sueros de monos en los que ambas clases de Acs aumentaban, aunque, existía un

predominio de la IgG<sup>139</sup> al contrario, por tanto, de nuestros resultados en los que existe un predominio de IgM. Ello puede estar relacionado con la elección de solo un pequeño subgrupo de casos y a que dicha selección se basó en las diferencias de los resultados de citotoxicidad. En realidad el comportamiento de las muestras totales es muy variable en cada animal y está influido enormemente por el tratamiento empleado en cada caso, como ha sido escrito en otros trabajos<sup>124</sup>.

- b) También es posible la existencia de una población de IgG no anti- $\alpha$ Gal (minimamente detectada por IFI) probablemente no citotóxica y que acompaña a la IgM propuesta para la expresión de la citotoxicidad en los sueros.

Esta idea está acorde con el escaso aumento de la citotoxicidad CCCF encontrada en los experimentos (1,29 veces) posteriores a la concentración de los sueros absorbidos. Un incremento de las IgG no citotóxicas pueden generar competencias e interferir estéricamente con la acción de la IgM, limitando el incremento de la citotoxicidad.

Se ha comprobado la capacidad de inhibición de la citotoxicidad mediada por IgM en presencia de IgG anti- $\alpha$ Gal humanas sobre células porcinas<sup>149</sup>. La capacidad supresora de estos Acs se produce por dos vías: 1) por el desplazamiento de las IgM de sus antígenos compitiendo con la IgG en dependencia de la afinidad de los Acs; 2) por la inhibición del complemento evitando la deposición del componente C1q. Aunque en principio ambas vías son reconocidas por xenoanticuerpos anti- $\alpha$ Gal<sup>149</sup>, mecanismos similares con participación de Acs anti- $\alpha$ Gal como Acs no- $\alpha$ Gal podrían ayudar a explicar estos datos relativos al limitado incremento de la citotoxicidad en los sueros concentrados.

Otro punto discutible puede ser el menor papel mediador de la citotoxicidad para las clases IgG activando complemento<sup>36,41,150</sup> frente al conocido papel de la IgM. Sin embargo, el estudio detallado de subclases IgG capaces de reconocer antígenos  $\alpha$ Gal en sueros humanos señalan para la IgG<sub>2</sub> una participación del 95%, para la IgG<sub>3</sub> en



34%, IgG<sub>1</sub> en 31% y la IgG<sub>4</sub> en 17%<sup>151</sup>. Esto significa que es posible la citotoxicidad mediada por complemento, si la participación de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> para estos antígenos fuese relevante.

En resumen todos estos resultados apuntan a la posibilidad de que Acs no anti- $\alpha$ Gal compartan relevancia en los mecanismos de daño citotóxico en el xenotrasplante. La identificación de las posibles dianas antigénicas sería fundamental en la prevención y el control del rechazo en modelos donde la respuesta anti- $\alpha$ Gal se ha inhibido profundamente pero en los que aun persisten alteraciones en los órganos trasplantados como es frecuente observar en el RXAH. Para tratar de identificar estos antígenos, nuestro estudio centró la atención en la variación de los antígenos detectados por la inmunoprecipitación con Acs de clase IgM de las moléculas contenidas en los lisados celulares, dado que esta clase de Acs es la que en los resultados del estudio tenía mayor posibilidad de participación en el mecanismo citotóxico.

En los WB de los sueros absorbidos, tanto pre-trasplante como en el momento RXHA, la presencia de un grupo de bandas a varios niveles demostró la persistencia de unos Acs residuales frente a varias proteínas en los lisados de PBL. Sin embargo al comparar este patrón de bandas con el obtenido con los sueros RXHA correspondientes, no se observó la aparición de ninguna banda nueva o adicional que indicase la presencia de IgM con otra especificidad diferente a la observada antes del trasplante.

En este sentido, en estudios previos que analizan también por WB, lisados de células endoteliales o plaquetas, se observó la desaparición casi absoluta de señales correspondientes a las bandas 115, 125 y 135 Kd<sup>147,83</sup> cuando se utilizaban sueros en los que se eliminaban los Acs  $\alpha$ Gal. Los resultados de uno de esos mismos trabajos<sup>147</sup>, demostraron una distribución desigual de las bandas (incluyendo las comprendidas en esos pesos moleculares) al comparar los WB de los sueros realizados contra lisados de hematíes y de los efectuados contra PBL. Tampoco los patrones anteriores se correspondieron con los de WB hechos contra lisados de células epiteliales, aun



cuando se realizó la absorción previa de los sueros con hematíes y PBL, y habiéndose producido la desaparición de las tres bandas ya mencionadas. Todos estos datos en conjunto han sido interpretados como la existencia en cada célula de distintos núcleos para la conformación de los antígenos  $\alpha$ Gal<sup>147</sup>. En resumen, tanto en esos trabajos como en el nuestro, pueden distinguirse otras bandas, además de las tres mencionadas, de variados pesos moleculares<sup>152</sup> que podrían ser diferentes en WB dependiendo del lisado celular empleado.

En las inmunoprecipitaciones de los lisados de hematíes con los sueros (aunque en menor número que en lisados de PBL) aparecieron bandas detectadas por IgM, tanto en los patrones obtenidos de antes y después del trasplante. Esto llevaría a concluir que en EHC, a pesar de la ausencia de respuestas hemolíticas de los sueros absorbidos, existe una cantidad de IgM con propiedades o funciones no muy precisas, que son capaces de unirse a epitopes en esas células. El hallazgo de los Acs unido a proteínas en sueros no hemolíticos, aunque sugiere marcadamente la presencia de Acs de tipo no citotóxicos, no puede excluir totalmente la posibilidad funcional de la existencia de algún Ac a bajas concentraciones ya que la sensibilidad de la técnica para detectarlos por inmunoprecipitación-WB podría ser superior a la sensibilidad de ECH.

Siguiendo la lógica de Landsteiner<sup>153</sup> sobre la limitación del espectro de idiotipos en un sujeto a un número limitado de Acs contra determinantes fundamentales, Parker<sup>36</sup> propuso, que a pesar de la variedad potencial de epitopes reconocidos entre las distintas células en experimentos de xenoreconocimiento, los Acs humanos son en su vasta mayoría homogéneos y reconocen de forma polirreactiva la molécula  $\alpha$ Gal, tal consideración simplificaría enormemente las posibilidades de diversificación de la respuesta de Acs en el xenotrasplante<sup>142</sup>. Si bien se confirma esta afirmación en la mayoría de los estudios, los informes actuales no ponen límites a las posibilidades de encontrar respuestas mas amplias frente a diferentes componentes proteicos, lipídicos, glucídicos y conformaciones naturales de distintos tejidos.

En este sentido, Buhler et-al hicieron hincapié en la naturaleza proteica de antígenos no  $\alpha$ Gal en el estudio ya citado<sup>139</sup> y comprobaron que una parte de los Acs no- $\alpha$ Gal están dirigidos a Antígenos del Sistema Leucocitarios Porcino (PSLA) con alguna reactividad cruzada entre sus genotipos, aunque la mayoría no esta específicamente restringida y parece dirigida contra varios epitopes del cerdo.

Entre otros posibles xenoantígenos no- $\alpha$ Gal identificados cabe destacar una nueva proteína de 45kd presente en hematíes, que permanece aún por caracterizar y explorar en otras células frente a otros determinantes menores que induce citotoxicidad de sueros AB humanos en hematíes desprovistos de estructuras  $\alpha$ Gal debida a tratamiento enzimático (Zhu<sup>138</sup>). Mas recientemente el mismo autor investigó la presencia de Acs no- $\alpha$ Gal dirigidos a epitopes NeuGc reconocidos sobre proteínas entre 55 y 65 Kd en WB<sup>144</sup> los cuales están presentes en humanos pero no en otros mamíferos incluyendo los primates por lo que no puede ser evaluado en este tipo de modelos.

Por otra parte Hallberg ha analizando las estructuras glicolípídicas reconocidas por hemaglutininas (además de los sustancias A y H de los grupos sanguíneos) que comparten terminaciones  $\alpha$ Gal sobre núcleos distintos; la Gal  $\alpha$ 1,3nLc<sub>4</sub>Cer<sup>154</sup>, la Gal  $\alpha$ 1,3 neolactotetraosil ceramida y la Gal  $\alpha$ 1,3 Le<sup>x155</sup>. Estas conformaciones las proponen como dianas con importantes posibilidades para que los Acs inicien el rechazo hiperagudo en los modelos de xenotrasplante de cerdo a humano.

También se ha demostrado que existe polimorfismo en el repertorio de los anti- $\alpha$ Gal 1,3 Gal<sup>151,156</sup>. Aunque el 66% de IgG reconoce cualquier tipo de estructura di, tri, o pentasacárida, existen fenotipos más restringidos a un solo tipo de estructura: penta 13%, tri-penta 12%, di-penta 8% y di-tri 1% y por tanto son reconocidos de forma distinta<sup>151</sup>. El amplio grado de polirreactividad de los xenoanticuerpos anti- $\alpha$ Gal permite que estos se unan a antígenos tan distintos como son las proteínas de citoesqueleto: actina, miosina, tubulina, después de haber sido purificadas por afinidad contra Gal  $\alpha$ 1,3 Gal $\beta$  1,4Glc NAC<sup>157</sup>. Ante tal grado de reactividad, y debido a la



presencia de sustancias tan diversas, la determinación y caracterización de respuesta no  $\alpha$ Gal se convierte en un problema muy complejo.

Según nuestros resultados, las pequeñas diferencias encontradas entre los métodos hemolíticos y CCCF con dianas diferentes, indirectamente apoyan la idea de que células de origen epitelial y los hematíes son diferentes en su expresión de antígenos y por tanto en la naturaleza de los Acs que son capaces de inducir. Teniendo en cuenta estos hechos y lo comentado por otros autores, consideramos que en medio de una respuesta fundamentalmente anti- $\alpha$ Gal, pueden existir Acs dirigidos a otros epitopes que están expuestos en células sanguíneas distintas a los hematíes, y probablemente también en otras células con diferentes orígenes, por lo que el ensayo CCCF podría ser útil dada su sensibilidad para la detección de la actividad citotóxica a través de expresión de antígenos  $\alpha$ Gal o de otras moléculas con niveles basales tan bajos y donde el EHC no puede registrarla.

La determinación objetiva y precisa de estas especificidades no- $\alpha$ Gal probablemente escape a las estrategias basadas únicamente en el principio del reconocimiento antígeno – Ac donde la polirreactividad y la complejidad antigénica dificultan la interpretación de los resultados. Fuera de la citotoxicidad directa mediada por el complemento, la participación funcional de estas moléculas en respuestas biológicas<sup>158</sup> está por definir. Últimamente se les comienza a atribuir un papel en la activación endotelial II mediante la activación de factor tisular<sup>159</sup>, IL8, selectinas E, P e ICAM<sup>121</sup>.

Debido a que los antígenos  $\alpha$ Gal son compartidos tanto por los PBL como por los hematíes de los cerdos, la densidad de expresión de antígenos  $\alpha$ Gal en la superficie celular u otra característica inherente a los PBL podría estar influyendo para favorecer la sensibilidad de CCCF sobre EHC en nuestros ensayos. Los experimentos WB de este trabajo no contemplaron la presencia de IgG, ni la participación de antígenos de otra naturaleza que la explorada en los lisados descritos, tales estudios serán necesarios para completar y abundar en estos resultados.



### 3. Papel del complemento en el xenorechazo de órganos de cerdos transgénicos hDAF.

La selección de moléculas reguladoras del complemento para el desarrollo de animales transgénicos con vistas a su uso en xenotrasplante cerdo / primates, se basa en parte en los resultados de los estudios de transfección de dichas moléculas sobre células porcinas. La expresión aislada o combinada de las principales moléculas (DAF, CD59, MCP) ha demostrado una clara efectividad en la protección de las células transfectadas frente a la acción de los sueros xenogenicos<sup>125,161-163</sup>. Así DAF se destacó, desde los primeros experimentos de este tipo, por sus ventajas en la protección del daño mediado por el complemento<sup>125</sup>, la molécula aislada es capaz de ejercer un nivel de protección superior a la presencia de MCP sola, y un nivel equivalente a la combinación de ambas moléculas en una célula doble transfectante. DAF acelera la disociación espontánea de la C3 convertasa y su unión con MCP, que la vez inactiva la misma enzima y aumenta la protección frente a la vía alterna del complemento<sup>161</sup>. Sin embargo, su papel en las células doble transfectadas se ha visto reducido al carecer la vía alterna de mayor importancia en los modelos cerdos / humano<sup>25,46</sup>.

La expresión de estos reguladores, incluyendo la de hDAF, ha demostrado sus efectos protectores en diferentes ensayos pre-clínicos de xenotrasplantes de órganos de cerdos transgénicos a monos<sup>100,101,164-168</sup>, y en experimentos "ex vivo" de modelos cerdos/humanos donde mejoran la función y la supervivencia de los distintos órganos perfundidos<sup>169-171</sup>.

En el presente estudio, se analizó la inhibición de la citotoxicidad humoral de un grupo de sueros de babuinos correspondientes a tiempos previos al tratamiento y post-trasplante, mediante tres métodos experimentales diferentes en cuanto al reconocimiento antigénico y la participación del complemento. A pesar de la variabilidad de los resultados obtenidos entre las diferentes muestras, la presencia del transgén hDAF indujo protección del daño mediado por el complemento detectado por los tres métodos CCCF exógeno, endógeno y EHC, siendo además la función

protectora independiente del origen de la especie elegida como fuente del complemento.

El efecto inhibitorio de la citotoxicidad debido a la presencia del transgén hDAF se demostró tanto sobre las muestras de babuinos pre-trasplante como sobre las muestras post-trasplante. En las muestras post-trasplante los valores de citotoxicidad sobre las células normales fueron en general mucho más bajos y dispersos que en la etapa pre-trasplante. Sólo dos muestras tuvieron cifras moderadamente altas, mientras que en las cinco muestras restantes la citotoxicidad estaba muy disminuida con respecto a las correspondientes pre-trasplante. Esto afectó la precisión en las determinaciones realizadas con cada técnica, encontrándose una discreta discrepancia entre los resultados de las técnicas ECH y CCCF exógeno aún cuando ambas empleaban la misma fuente de complemento. Tres factores que pudieron influir en este sentido son: 1) la posible diferencia cualitativa entre los antígenos reconocidos frente a las diferentes dianas utilizadas por los métodos, 2) la expresión cuantitativamente diferente de hDAF en hematíes o PBLs y 3) la participación de las distintas clases de Acs contenidos en los sueros en cada momento de las muestras evaluadas, todos ya comentados.

El alto grado de variabilidad inherente a cada animal, observado en la determinación de la citotoxicidad mediada por complemento en las diferentes muestras de babuinos, también se ha descrito para muestras de suero humano tanto para los parámetros relacionados como la presencia de clases IgG e IgM anti- $\alpha$ Gal, como para la de Acs totales anti-células porcinas unidas a membranas<sup>156,172,173</sup>. En estudios de protección con células transgénicas la expresión individual del transgen en los distintos animales debe ser añadida como otra fuente de variación en el análisis de la citotoxicidad. La variación funcional observada en la reducción de la citotoxicidad (entre el 10% y el 51%) hallada en nuestros estudios sobre las células de los 9 cerdos analizados por CCCF con el suero humano control estaba directamente relacionada con el grado de expresión de hDAF e inversamente con la expresión de antígenos  $\alpha$ Gal detectados en IFI.



Por otra parte en nuestros datos, el grado de inhibición producido por la presencia del transgen también se asoció inversamente con la concentración de IgM o IgG anti- $\alpha$ Gal contenida en los sueros. Esto confirma la predominante importancia de este antígeno en la inducción de citotoxicidad humoral bien conocida en estos modelos de xenotrasplantes<sup>28-30</sup>. La relación entre los títulos de Acs anti- $\alpha$ Gal y la citotoxicidad de sus sueros fue estadísticamente demostrada para CCCF exógeno frente a PBL pero no llegó a serlo con EHC, lo que a veces ocurre en estudios de correlación entre estos parámetros<sup>156,172,173</sup>, sin embargo, el valor real de CCCF exógeno en el seguimiento pre-clínico de los modelos de xenotrasplantes queda todavía por definir. El PBL no es una línea celular estandarizada y pese a usar siempre el mismo cerdo control en los experimentos, pueden originarse ciertas variaciones de los diferentes estados en la vida diaria de un mismo cerdo o de la utilización de otro cerdo diferente. El CCCF es también un ensayo estrictamente dependiente del número de células por lo que las variaciones entre los ensayos son más probables que en el EHC. En este, el número de hematíes, no se establece por conteo sino por volumen de la suspensión celular añadida, siendo siempre el número de células mayor que el usado en CCCF. Todos estos factores pueden influir y han de tenerse en cuenta, a la hora de establecer una valoración del test para estudios de seguimiento ó monitorización clínica.

El uso de órganos transgénicos en los modelos discordantes no ha sido tan eficaz para prevenir el RXHA como lo ha sido en la eliminación del rechazo hiperagudo. El RXHA se asocia "in vivo" con el depósito y la activación del complemento en los modelos que usan cerdos hDAF transgénicos incluso con el uso de protocolos farmacológicos de inmunosupresión<sup>126,174</sup>. En estos casos se ha encontrado un aumento de componentes del complemento que supone el doble de C3a y de hasta 4 veces el C5b-9 en el plasma y en los tejidos de los órganos de los animales rechazados<sup>126</sup>. Para explicar la presencia de productos del complemento en los tejidos de los animales transgénicos se ha propuesto que la masiva activación del sistema, que sigue a la unión de IgM e IgG al endotelio, llegue a sobrepasar las posibilidades funcionales reguladoras de la molécula DAF<sup>126</sup>



Esta idea esta de acuerdo con los resultados de experimentos “ex vivo” donde la eficacia de los corazones de ratas transgénicas hDAF para evitar el rechazo hiperagudo está limitada por la concentración de suero administrada<sup>175</sup>. En nuestros experimentos “in vitro” nosotros encontramos que la incubación con IgM monoclonal murina anti-porcina indujo citotoxicidad mediada por complemento de conejo de forma dosis dependiente, que fue inhibida por la presencia del transgén en un grado variable. Carrington y dos santos Cruz<sup>176</sup> han encontrado relación entre el número de moléculas hDAF y la capacidad de protección en un modelo “in vitro” con células endoteliales, pero también para ellos a partir de cierto número crítico de moléculas la expresión de hDAF no ofrece una protección superior. Costa y cols<sup>177</sup> demostraron que dependiendo de la cantidad de CD59 o la expresión conjunta con otras moléculas (1,2 fucosil transefasa) que expresaban líneas distintas, se producía reducción funcional de la citólisis mediada por sueros humanos.

La susceptibilidad al rechazo hiperagudo entre especies discordantes cuestiona la eficacia de la presencia de las moléculas reguladoras heterólogas para controlar la activación del complemento. El presente trabajo, como otros, demuestra la protección de hDAF<sup>170,171</sup> frente a fuentes de complemento de origen distinto pero además la existencia de una relación entre dicha protección y el número de moléculas hDAF expresado.

Al comparar mediante el mismo tipo de método (CCCF) el efecto de dos fuentes de complemento endógenas, con diferente grado de homología respecto a las moléculas reguladoras del complemento expresadas en sus dianas como son: el SHC, homólogo respecto al transgen hDAF y el SBC, algo menos relacionado genéticamente, encontramos un mayor grado de protección frente a la citotoxicidad cuando las células se expusieron al suero humano que cuando se hizo con el suero de babuino. El efecto se reprodujo (independientemente del grado de inhibición específica aportado por cada cerdo) en todas las células transgénicas hDAF de los distintos cerdos evaluados. Estos resultados aunque no constituyen una prueba definitiva de que la protección de un

órgano hDAF transgénico sea mejor ante el suero humano que frente a la exposición del babuino (ya que los Acs de uno u otra especie varían pueden variar en número y características), sí que es una aproximación válida “in vitro” ya que incluye todo el conjunto de efector que participa en el mecanismo citotóxico humoral, es decir los Acs y el complemento propios del suero.

Por otra parte, la IgM monoclonal murina anti-porcina, que produjo citotoxicidad mediada por complemento externo sin de la presencia de Acs anti- $\alpha$ Gal, no induce daño en las células porcinas normales si estas son expuestas a la acción del complemento autólogo ni aún a concentraciones 12 veces mayores. Dado que obviamente aquí se compara la citotoxicidad por procedimientos diferentes, la del CCCF exógeno con la del CCCF endógeno utilizado para la evaluación con SCN, nuestros resultados también demuestran que la acción citotóxica de la IgM sobre las células porcinas no es sólo el resultado de la presencia más concentrada de la fuente de complemento externa. En presencia del complemento endógeno, en este caso el SHC, con los Acs anti- $\alpha$ Gal suficientemente inhibidos, se produce citotoxicidad inducida por la IgM murina y mediada por complemento endógeno.

Desde hace tiempo se está estudiando el grado de restricción homóloga en las moléculas reguladoras del complemento<sup>178,179</sup>. Las proteínas reguladoras de membrana MCP, DAF y CD59 tienen un papel fundamental en el control de la activación homóloga aunque otras moléculas de fase fluida como es el factor H también juegan un papel importante<sup>180</sup>. El papel protector de CD59 es extensible a otras especies e incluso a veces con mayor poder sobre el complemento heterólogo<sup>181-183</sup>. Sin embargo los estudios con DAF han ofrecido resultados algo más controvertidos, en ocasiones el bloqueo de DAF por los Acs tanto en células nucleadas como en hematíes, promueve la lisis mediada por el complemento homólogo, pero no tiene efecto sobre el complemento heterólogo sugiriendo selectividad de especie, sin embargo otras veces el bloqueo favorece la lisis inducida por complemento heterólogo indicando que la función se realiza de forma no restrictiva<sup>184-188</sup>. Harris et-al demostraron una especie de orden de protección en células CHO (línea tumoral de ovario hamster) transgénicas



para DAF de rata, ratón o humana frente al complemento humano en un rango que va de humano, a rata y ratón y que sugiere además que la selectividad de especie en DAF es mas restringida en la vía alternativa de activación<sup>189,190</sup>.

Nuestros resultados concuerdan con estos resultados recientes señalados. DAF ejerce un efecto control frente a la activación por complemento homólogo y heterólogo, es decir participa de manera no restringida en la protección al daño citotóxico, pero existe un orden de homología que hace más efectiva su función frente al complemento su misma especie.

En resumen considerando nuestros resultados junto con el resto de los datos actuales, en órganos transgénicos que han sido sometidos de algún modo a efectores humorales, incluso en animales con depleción de Acs anti- $\alpha$ Gal, la presencia de componentes del complemento activado podría explicarse, por el agotamiento funcional de las moléculas transgénicas frente a un número variable y frecuentemente creciente de elementos inmunológicos de respuesta. Es decir, a la aparición de xenoanticuerpos de cualquier tipo ( $\alpha$ Gal o no-Gal) y del complemento. La cantidad necesaria para inducir RXHA no se ha determinado pero debería depender de los tipos de mecanismos utilizados para la iniciación de este tipo de rechazo. En este sentido creemos que se pueden considerar tres formas diferentes de mecanismos de iniciación de rechazo: a) los Acs anti- $\alpha$ Gal o no- $\alpha$ Gal inducen un mínimo de citotoxicidad y la presencia de algunos componentes del complemento estimula la reacción; b) la presencia de tales xenoanticuerpos basta por si solos; y c) que ambos mecanismos actúan conjuntamente y se complementan.



## ***CONCLUSIONES***

## VI. CONCLUSIONES

1. El ensayo citotóxico por citometría de flujo mediante doble tinción Daf / IP (CCCF) es un método útil para la evaluación de la citotoxicidad humoral que permite la medición objetiva de la actividad lítica funcional en las diferentes muestras de sueros.
2. En este ensayo, el uso de fuentes exógenas o endógenas de complemento permite evaluar la presencia de Acs citotóxicos con independencia de la acción del propio complemento contenido en los sueros o alternativamente el poder citotóxico de la muestra en conjunto (Acs y complemento). La flexibilidad del método permite analizar la citotoxicidad frente a células dianas diferentes, por lo que podría contribuir al estudio de respuestas contra distintos antígenos.
3. El cálculo de las ULS obtenidas a partir de los valores de las diluciones del suero mediante ajustes de modelos matemáticos, en particular por la ecuación de VK, es una forma adecuada para la expresión resumida de la citotoxicidad medida por CCCF.
4. La respuesta citotóxica humoral en el modelo discordante cerdo / babuino presenta variaciones individuales importantes; sin embargo, se confirma que tanto los Acs naturales como los desarrollados tras el trasplante están dirigidos mayoritariamente a determinantes antigénicos  $\alpha$ Gal.
5. Nuestros resultados sugieren que aunque la eliminación de Acs anti- $\alpha$ Gal del suero de los receptores primates no humanos es suficiente para evitar el rechazo hiperagudo, existen evidencias suficientes para creer que otras reactividades no- $\alpha$ Gal intervienen también en la respuesta y pueden probablemente ser suficientes para iniciar el RXHA.

6. En algunos animales, las diferencias entre la actividad citotóxica de las muestras constatada frente a eritrocitos y PBL porcinos, refleja la diferente presencia de estructuras antigénicas entre ambos tipos de células y sugiere que la detección de Acs citotóxicos únicamente por métodos hemolíticos en esos animales es insuficiente para detectar todas las posibles xenoreactividades. Por tanto se deduce que en los ensayos pre-clínicos debería probarse la utilidad de varios métodos funcionales que midan la citotoxicidad no solo en hematíes sino también sobre PBL u otros tipos de células.
7. La caracterización y aislamiento de nuevos epitopes no- $\alpha$ Gal es compleja dada la polirreactividad de los Acs participantes y la inclusión de los determinantes  $\alpha$ Gal en diferentes componentes estructurales de la célula. Ello limita las estrategias basadas en el reconocimiento inmunológico y plantea la aplicación de otros métodos ausentes hasta hoy.
8. La presencia del transgén hDAF protege “in vitro” de la acción del complemento tanto homóloga como heteróloga, sin embargo, el grado de protección que aporta está influido por: 1) el grado de expresión en las superficies celulares de las moléculas transgénicas, 2) la presencia de los xenoanticuerpos IgG e IgM dirigidos a los antígenos expuestos en las membranas incluyendo las  $\alpha$ Gal y 3) el grado de homología genética entre el gen transfectado y la fuente de complemento mediador del daño citotóxico.
9. Una hipótesis que podría explicar la susceptibilidad al rechazo de órganos transgénicos que han sido sometidos a procesos de xenotrasplantes, podría ser el hecho de que el número de moléculas del transgen presentes tras el trasplante no sea suficiente funcionalmente para regular el considerable aumento de efectores inmunológicos (complemento y xenoanticuerpos de cualquier tipo) que se produce. La cantidad necesaria de estos elementos para inducir RXHA podría estar relacionada con los mecanismos utilizados para la iniciación de este tipo de rechazo.



## ***REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Samstein B, Platt J. Physiologic and Immunologic hurdles to xenotransplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12:182-193.
2. Cooper DKC, Gollackner B, Knosalla C, Teranishi K. Xenotransplantation-how far have we come? *Transplant Immunol*. 2002; 9:251-256.
3. Reemtsma, K. Renal heterotransplantation from nonhuman primates to man. *Ann. NY Acad. Sci.*1969;162:412-18.
4. Auchincloss H, Sachs D. Xenogeneic Transplantation. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:433 – 470.
5. Xenotrasplantation. [www.biomednet.com](http://www.biomednet.com) febrero,2003
6. Cooper DKC, Lanza RP. Xeno. The promise of transplanting animal organs into humans. Oxford, N Y: Univerity press; 2000.p.1-274
7. Datos de Actividad de Donación y Trasplantes en España. [www.msc.es/ont](http://www.msc.es/ont). 2003
8. Platt J, Di Sesa V, Gail D, Fisher-Massicot J. Recommendations of National Heart, Lung, and Blood Institute Heart and Lung Xenotransplantation Working Group. *Circulation* 2002; 106:1043-1047.
9. Hammer C. Evolutionary obstacles to xenotransplantation. In Cooper DKC, Kemp E, Platt JL, White DJG, editors. *Xenotransplantation*. Heidelberg: Springer. 1996. p.716-735.
10. Gritsch HA, Glaser RM, Emery DW, Lee LA, Smith CV, Sablinski T, Arn JS, Sachs DH, Sykes M. The importance of nonimmune factors in reconstitution by discordant xenogeneic hematopoietic cells. *Transplantation*. 1994; 57:906-17.
11. Gritsch HA, Sykes M. Host marrow has a competitive advantage that limits donor hematopoietic repopulation in mixed xenogeneic chimeras. *Xenotransplantation*. 1996; 3:312-320.
12. Lawson JH, Daniels L, Platt JL. The evaluation of thrombomodulin activity in porcine to human xenotransplantation. *Transplant Proc*. 1997; 29:884-885.
13. Calne RY. Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant Proc*.1970; 2:550-553.
14. Auchincloss H. Xenogeneic transplantation. *Transplantation*.1988;46:1-20

15. Patience C, Takeuchi Y, Weis RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Medicine*. 1997; 3:282-286.
16. Heneine W, Tibell A, Switzer WM, et-al No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet–cell xenografts. *Lancet*.1998; 352:695-699.
17. Patience C, Patton GS, Takeuchi Y, Et-al. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short–term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet*. 1998; 352:699-701.
18. Mollison PL, Engelfried CP, Contreras eds M. Red cells antibodies against self antigens bound antigens and induced antigens. En. *Blood Transfusion in clinical medicine*. Oxford. UK Blackwell Scientific Publications.1987:410-452.
19. Perper RJ, Najarian JS. Experimental renal heterotransplantation. I: In widely divergent species. *Transplantation* .1966; 4:377
20. Leventhal JR, Sakiyalak P, Witson J et-al. The synergistic effect of combined antibody and complement depletion on discordant cardiac xenograft survival in non-human primates. *Transplantation* .1994; 57:974-977
21. Cascalho M, Platt JL. The immunological Barrier to xenotransplantation. *Immunity*. 2001; 14:437-446.
22. Brouard S, Gagne K, Blancho G, Soullillou J P. T cell response in Xenorecognition and xenografts. A review. *Human Immunology* 1999; 60:455-468.
23. Dorling A, Lechler RI T cell mediated xenograft rejection: Specific y tolerance is probably required for long term xenograft survival. *Xenotransplantation* 1998; 5: 234-245.
24. Dorling A, Lechler R. Xenotransplantation. Eds Sathia Thiru and Herman Waldmann. In *Pathology and Immunology of Transplantation and rejection*. Blackwell Science. Malden MA.2001.p.137-176
25. Platt JL, Vercelloti GM, Dalmaso AP, et-al Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunology Today* 1990; 11:450-456.
26. Bach FH, Turman MA, Vercelloti GM, Platt JL, Dalmaso AP, Accommodation: a working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting. *Transplant Proc*.1991; 23:205-207.



27. Galili U, Shohet SB, Kobrin E, et-al Man , Apes and Old world monkeys differ from the other mammals in the expression of  $\alpha$  galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 1988; 263:17775.
28. Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, et-al. A unique natural human IgG antibody with anti  $\alpha$  galactosyl specificity. *J Exp Med.* 1984; 260:1519.
29. Good AH, Cooper DKC, Malcom AJ, et-al. Identification of carbohydrate structures that bind human anti-porcine antibodies: implication for discordant xenografting in humans. *Transplant Proc.* 1992; 24:559.
30. Cooper DKC, Good AH, Koren E, et-al Identification of a galactosyl and other carbohydrat epitope that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man. *Transplant Immunol.* 1993; 1:198.
31. Sandrin MS, Vaughan HA, Dabrosky PL, McKenzie IFC: Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal a (1,3)Gal epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:11391-11395.
32. Taniguchi S, Neethiling FA, Korchagina EY, Bovin N, Ye Y, Kobayashi T, Niekrasz M, Li S, Koren E, Oriol R, Cooper DKC. "In vivo" immunoadsorption of anti-pig antibodies in baboons using a specific Gal  $\alpha$  1-3Gal Colum. *Transplantation.*1996; 62:1379-1384.
33. Kearns-Jonker MK, Cramer DV, Dane LA, Swenson JM, Makowa L. Human serum reactivity to porcine endothelial cells after anti sense mediated down-regulation of GpIIIa expression. *Transplantation.* 1997;63:588-93
34. Lin SS, Parker W, Holzknicht Z, Platt JL. Quantitative evaluation of porcine endothelial cell antigen recognized by human natural antibodies: an analysis by Western blotting. *Xenotransplantation*1996; 3:120-27
35. Aspeslet LJ, Chackowsky P, Sekhon H, Malcom Aj, Mosleh Z, Koshal A, Yatscoff RW. Identification of porcine membrane antigens involved in cytotoxic response mediated by human xenoreactive antibodies. *Xenotransplantation.* 1996; 3:1-10.
36. Parker W, Bruno D, Holzknicht ZE, Platt JL. Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies. *J. Immunol.*1994, 153, 3791-803.

37. Turman MA, Casali P, Notkins AL, Bach FH, Platt JL. Polyreactivity and antigen specificity of human serum natural antibodies. *Transplantation*. 1991; 52:710-717.
38. Platt JL. The immunological barriers to xenotransplantation. *Transplantation*. 1996; 16:331-58.
39. Tusio PJ, Cramer DV, Middleton YD et-al. Pig Aortic endothelial cell antigen recognized by human IgM natural antibodies. *Transplantation*. 1993; 56:651-55.
40. Bartholomew A, Latinne D, Sachs DH, Arns JS, Gianello P, De Bruyere M, Sokal G et-al. Utility of xenograft: lack of correlation between PRA and natural antibodies to swine. *Xenotransplantation*. 1997; 4:34-39.
41. Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolman RM, Bach FH. Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in swine-to-primate model. *Transplantation*. 1991. 52:214-220.
42. Dalmaso AP, Vercellotti GM, Fishel RJ, Bolman RM, Bach FH, Platt JL. Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipient. *Am J Pathol*. 1992, 140:1157-66.
43. Leventhal JR, Matas AJ, Sun LH. The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to rat model. *Transplantation*. 1993;56:1-8
44. Johnston PS, Wang MW, Lim S, Wright LJ, White DJG. Discordant xenograft rejection in an antibody free model. *Transplantation*. 1992;54:573-576
45. Zhou XJ, Niesen N, Pawlowski J et-al. Prolongation of survival of discordant kidney xenografts by C6 deficiency. *Transplantation*. 1990; 50:896-898.
46. Sablinski, Latinne D, Gianello P, Bailin M, Bergen K, et-al Xenotransplantation of pig kidneys to nonhuman primates I. Development of the model. *Xenotransplantation* 1995; 2:264-270.
47. Bach FH, Winkler H, Ferran C, Hancock WW, Robson SC. Delayed xenograft rejection. *Immunol Today*. 1996; 17:379-384.
48. Al-Mohanna F, Collison K, Parthar R, Kwaasi A, Meyer B, Saleh S, Stern D, Yacoub M. Activation of naïve xenogeneic but not allogeneic endothelial cells by human naïve neutrophils :a potential occult barrier to xenotransplantation. *Am J Pathol*. 1997;151:111-120



49. Chan DV, Auchincloss H Jr. Human anti-pig cell-mediated cytotoxicity "in vitro" involves not as well T cell components. *Xenotransplantation*.1996; 3:158-155.
50. Inverardi L, Samaja M, Motterlini R, Mangili F, Bender JR, Pardi R. Early recognition of a discordant xenogeneic organ by human circulating lymphocytes. 1992. *J Immunol*; 149:1416-1423.
51. Sharabi Y, Aksentijevich I, Sundt TMII, Sachs DH, Sykes M. Specific tolerance induction across a xenogenic barrier: production of mixed rat/mouse lymphohematopoietic chimeras using a non lethal preparative regimen. *J Exp Med* 1990; 172:195-202.
52. Smyth MJ, Taniguchi M, Kawano T, Kelly JM. Accessory function for NK1.1+ NK cells producing interferon  $\gamma$  in xenospecific CTL differentiation. *Transplantation* 1999; 68:840-843.
53. Bustos M, Saadi S, Platt JL. Platelet-mediated activation of endothelial cells: implications for the pathogenesis of transplant rejection. *Transplantation*. 2001; 72:509.
54. Germain RN, MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994; 76:287-299.
55. Gill R, Wolf L: Immunobiology of cellular transplantation. *Cell Transplant* 1995; 4: 361
56. Lucas P, Shearer GM, Neudford S, Gress RE. The human anti-murine xenogeneic cytotoxic response : dependence on responder antigen presenting cells. *J Immunol* 1990. 144: 4548
57. Alter BJ, Bach FH. Cellular basis of proliferative response of human T cells to mouse xenoantigens. *J Exp Med*.1990; 191:333-338.
58. Bravery CA, Batten P, Heaton , Yacoub MH, Rose ML, Direct recognition of SLA and HLA like class II antigens on porcine endothelium by human T cell results in T cell activation and release of interleukin 2 . *Transplantation* 1995; 60: 1024.
59. Choo JK, Seebach JD, Nickleit V, Shimizu A, Lei H, Sachs DH, Madsen JC, Species differences in the expression of major histocompatibility complex class



- II /antigens on coronary artery endothelium : implication s for cell mediated xenoreactivity . Transplantation 1997; 64:1315.
60. Davis TA, Craighead N, Williams AJ, Scadron A, June CH, Lee KP, Primary porcine endothelial cell express membrane bound B7-2 (CD86) and a soluble factor that co-stimulate cyclosporin A resistant and CD28 dependent human T cell Int Immunol 1996; 8:1099.
61. Dorling A, Binns R, Lechler RI. Cellular response: Although vigorous direct human T cell anti-pig primary xenoresponses are significantly weaker than equivalent alloresponses. Xenotransplantation 1996; 3:149
62. Kirk AD, Li RA, Kirch MS, Abernethy KA, Doyle C, Bollinger RR, The human anti-porcine cellular repertoire. Transplantation 1993; 55:924
63. Yamada K, Sach DH, Dersimonian H: Human antiporcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. J Immunol 1995; 155:5249
64. Landes J. Graft .1998; 1:19-24.
65. Gonsalus JR, Brady DA, Coulter SM, Gray BM, Edge A. reduction of serum cholesterol in watanabe rabbits by xenogeneic hepatocellular transplantation. Nat Med.1997; 3: 48-53.
66. Platt JL, Vercelloti GM, Lindman BJ, Oegema TRJ, Bach FH, Dalmaso AP. Release of heparan sulfate from endothelial cell: implications for pathogenesis of hyperacute rejection. J. Exp. Med. 1990; 171:1363- 68.
67. Grey ST, Hancock WW. A Physiologic anti-inflammatory pathway based on thrombomodulin expression and generation of activate protein C by human mononuclear phagocytes. J Immunol. 1996; 156:2256-63.
68. Robson SC, Siegel JB, Lesnikoski BA, Kopp C, Candinas D, Ryan U , Bach FH. Aggregation of human platelets induced by porcine endothelial cells is dependent upon both activation of complement and thrombin generation. Xenotransplantation.1996; 3:24-34.
69. Nagayasu T, Saadi S, Holzknecht RA, Patte CA, Plummer TB, Platt JL. Expression of tissue factor mRNA in cardiac xenografts: clues to the pathogenesis of acute vascular rejection. Transplantation 2000; 69:475-482.

70. Lin SS, Hanaway MJ, Gonzalez-Stawinski GV, Lau CL, Parker W, Davis RD, Byrne GW, Diamond LE, Logan JS, Platt JL. The role of anti-Gal  $\alpha$ 1-3 Gal antibodies in acute vascular rejection of xenotransplant and accommodation of xenografts. *Transplantation*. 1997; 1667-1674.
71. Boulday G, Coupel S, Coulon F, Soulillou JP, Charreau B. Antigraft antibody-mediated expression of metalloproteinases on endothelial cells. Differential expression of TIMP-1 and ADAM-10 depends on antibody specificity and isotype. *Cir Res*. 2001; 71:430.
72. DiCarlo A, Tector AJ, Liu S. et-al. Activation of porcine hepatic micro vascular sinusoidal endothelial cells in pig to human liver xenotransplantation. *Transplant Proc*. 2001; 33:759.
73. Saadi S, Holznecht RA, Patte CP, Platt JL. Endothelial cell activation by pore forming structures: pivotal role for IL-1a. *Circulation*. 2000; 101:1867-1873.
74. Lin Y, Soares MP, sato K, Takigami K, Csizmadia E, Smith N, Bacht FH. Accommodate xenografts survive in the presence of anti-donor antibodies and complement that precipitate rejection of naive xenografts *J. Immunol* 1999; 163:2850-2857.
75. Bach FH, Ferran C, Hechenleitner P, Mark W, Koyamada N, Miyatake T, et-al. Accommodation of vascularized xenografts: Expression of "protective genes" by donor endothelial cells in host Th2 cytokine environment. *Nat Med* 1997; 3:196-204
76. Dorling A, Jordan W, Brookes P, Delikouras A, Lechler RI. Accommodate pig endothelial cells promote nitric oxide-dependent Th2 cytokine responses from human T cells. *Transplantation* 2001;72:1597
77. Koulmanda M, McKenzie IFC, Sandrin MS, Mandel TE. Fetal pig islet xenografts in NOD-Lt mice: The effect of peritransplant anti-CD4 monoclonal antibody and graft immunomodification on graft survival and lack of the expression of GAL ( $\alpha$ 1,3) GAL on endocrine cells. *Xenotransplantation*. 1995; 2:295-305.
78. Wecker H, Winn HJ, Auchincloss HJ. CD4+ cells without CD8+ or B lymphocytes can reject xenogeneic skin graft. *Xenotransplantation*. 1994; 1:8-16.



79. Morris CF, Simenovic CJ, Fung MC, Wilson JD, Hapel AJ, Intragraft expression of cytokine transcripts during pig pro islet xenograft rejection and tolerance in mice. *J Immunol.* 1995; 154:2470-82.
80. Moberg AW, Shons AR, Gerwuz H, et-al. Prolongation of renal xenografts by the simultaneous sequestration of performed antibody , inhibition of complement, coagulation, and antibody synthesis. *Transplant Proc*1971; 3:538.
81. Terman DS, Garcia-Rinaldi R, McCalmon R, et-al modification of hyperacute renal xenograft rejection after extracorporeal immunoadsorption of heterospecific antibody. *Int J Artif Organs.* 1979; 2:35.
82. Azimzadeh A, Meyer C, Watier H, et- al. Removal of primate xenoreactive natural antibodies by extracorporeal perfusion of pig kidneys and livers. *Transplant Immunol.* 1998 ;1:13
83. Macchiarini P, Oriol R, Azimzadeh A, Montepreville V, Rieben R, Bovin N, Mazmanian M, Darteville P. Evidence of human on alpha Galactosyl antibodies involved in hyperacute rejection of pig lungs and their removal by pig organ perfusion. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 116:831-843
84. Lambrigts D, Sachs D H, Cooper DKC. Discordant organ xenotransplantation in primates. *Transplantation* 1998, 66:549.
85. Alexandre GPJ, Gianello P, Latinne D, et-al. Plasmapheresis and splenectomy in experimental renal xenotransplantation. In Hardy MA, eds *Xenograft.* N Y, Elsevier, 1989.p.25
86. Palmer A, Welsh K, Gjorstrup P, et-al removal of HLA antibodies by extracorporeal immunoadsorption to enable renal transplantation. *Lancet* 1989; 1:10.
87. Alwayn IP, Basker M, Buhler L, Cooper DKC. The problem of anti-pig antibodies in pig to primate xenografting: current and novel methods of depletion and/or suppression of production of anti-pig antibodies. *Xenotransplantation.* 1999; 6:157-168.
88. Kozlowski T, Ierino FL, Lambrigts D, et al. Depletion of anti- $\alpha$  Gal 1-3Gal antibody in baboons by specific columns. *Xenotransplantation.* 1998; 5:122.



89. Katopodis AG, Warner RG, Duthaler RO, Streiff MB, Bruelisauer KO, Dorobek B, et-al Removal of anti Gal  $\alpha$  1,3 Gal xenoantibodies with an injectable polymer. *J Clin Invest* 2002; 110:1869-77.
90. Wordell CJ, Use of intravenous immune globulin therapy: on overview. *DICP*. 1991; 25:805.
91. Koren E, Milotic F, Neethling FA, et-al. Monoclonal anti-idiotypic antibodies neutralize cytotoxic effects of anti- $\alpha$  Gal antibodies. *Transplantation*.1996; 62:837.
92. Leventhal, JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, Plat JL, Manivel CJ, Bolman RM, Matas AJ. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation*. 1993; 55:857-866.
93. Fiane AE, Videm V, Johansen HT, Mellbye OJ, Nielsen EW, Mollnes TE. C1 Inhibitor attenuates hyperacute rejection and inhibits complement, leukocyte and platelet activation in an "ex vivo" pig to human perfusion model. *Immunopharmacol*.1999; 42:231-243.
94. Sahu A, Lambris JD. Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics. *Immunopharmacol*.2000; 49:133-148.
95. PruittSK, Kirk ADF, Bollinger RR, Marsh HC Jr, Collins BH, Levin JL, Mault Jr, Heinle JS. Et -al. The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute rejection of porcine xenograft. *Transplantation*.1994; 57:363-370.
96. Kroshus TJ, Rollins SA, Dalmaso AP, Elliot EA, Matis LA, Squinto SP, Bolman RM: Complement inhibition with an anti C5 monoclonal antibody prevents acute cardiac tissue injure in an "ex vivo" model of pig to human xenotrasplantation. *Transplantation*: 1995; 60:1194-1202.
97. Sandrin MS, Fodor, WL, Mouhtouris E, Osman N, Cohny S, Rollins SA, Guilmette ER, Setter E, Squinto SP, Mckenzie I. Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogeneic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytolyis. *Nat Med*.1995; 1:1261-1267.
98. Osman N, McKenzie IF, Ostenried K, IoannouYA, Desnick RJ, Sandrin MS: Combined transgenic expression of  $\alpha$  galactosidase and 1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal  $\alpha$ (1,3)Gal . *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:14677-14682.

99. Vanhove B, Charreau B, Cassard A, Pourcel C, Soullillou JP Intracellular expresion in pig cells of anti-alfa 1,3 galactosil-transferase single chain Fv anti reduces Gal alfa (1,3)Gal expresion and inhibits cytotoxicity mediate by anti-Gal xenoantibodies Transplantation 1998; 66:1477-1485
100. Cozzi E, White DJG: The generation of transgenic pig s as potential organ donors for human. Nat Med 1995; 1:964-966.
101. Byrne GW, Mc Curry KR, Martin MJ, McClellan SM, Platt JL, Logan JS. Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement- mediated damage. Transplantation. 1997; 63:149-155
102. Stewart J, Hinchliffe SJ, Rushmere NK, Hanna SM, Morgan BP. Molecular cloning and functional characterization of pig analogue CD59: relevance to xenotransplantation. J Immunol 1998;160:3924-3932
103. Wekerle T, Sykes M. Mixed chimerism as an approach for the induction of transplantation tolerance. Transplantation.1999; 68:459-467.
104. Sandrin MS, McKenzie FC. Recent advances in xenotransplantation. Curr opinion Immuno.1999; 11:527-531.
105. Dambrin C, Klupp J, Morris R. Pharmacodynamics of immunosupresive drugs. Curr opinion Immunol. 2000; 12:557-562.
106. Pleyer U, Ritter T, Volk HD. Immune tolerance and gene therapy in transplantation. Trends.2000; 21:12-14.
107. Effector Mechanism of Humoral Immunity. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS eds. Cellular and Molecular Immunology. WB Saunders Company. Philadelphia. USA.2000 p.309-334
108. Mayer M M, Complement and complement fixation. In : A Kabat and MM Mayer Editors. Experimental Immunochemistry. Charles C Thomas, Springfield IL. 1961.p 133.
109. Detrick-Hooks B, Borsos T, Rapp H J. Quantitative comparison of techniques usedd to measure complement- mediated cytotoxicity of nucleated cells. J Immunol 1975; 114:287-290.



110. Wigzell H. Quantitative titrations of mouse H2 antibodies using CR 51 labelled target cells. *Transplantation* 1965; 85:423-31.
111. Sanderson AR, Applications of iso-immune cytotoxicity using radiolabelled target cells *Nature* 1964; 204:250-53.
112. Edidig M. A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J Immunol* 1970; 104:1303-06.
113. Horan PK Kappler JW. Automated fluorescent analysis for cytotoxicity assays *J Immunol Meth* 1977; 18: 309-16.
114. Brawn RJ, Barker CR, Oesterle AD, Kelly RJ, Dandliker WB. An improved fluorescence probe cytotoxicity assay. *J Immunol Meth* 1975; 9:7-26.
115. Loken M, Stall A. Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology. *J Immunol Meth* 1982; 50:R85-R112.
116. Zaidi A, Schmoekel M, Bhatti F, Waterworth P, Tolan M, Cozzi F, Chavez G, Langford G. et-al Life supporting pig-to-primate xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation*. 1998; 65:1584-90.
117. Mañez R, Blanco FJ, Diaz I, Centeno A, Lopez-Pelaez E, et-al. Removal of bowel aerobic gram-negative bacteria is more effective than immunosuppression with cyclophosphamide and steroids to decrease natural a galactosyl IgG antibodies. *Xenotransplantation*. 2001; 8:15-23.
118. Koren E, Neethling FA, Kosec M, Kujundzic M, Richards SV, Ye Y, Oriol R, Cooper DKC. "In vitro" model for hyperacute rejection of xenogeneic cells. *Transplant Proc.* 1994; 26:1166.
119. Neethling FA, Koscec M, Oriol R, Cooper DKC, Koren E. A reliable, rapid and inexpensive two color fluorescence assay to monitor serum cytotoxicity in xenotransplantation. *J Immunol Meth*. 1999; 222:31-44.
120. Giclas PA. Complement test. In: Rose NR, Conway de Macario E, Folds JD, Clifford Lane H, Nakamura R, editors. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington American Soc for Microbiol (AMS); 1997. p 181-186.
121. Porcel JM, Peakman M, Senaldi G, Vergani D. Methods for assessing complement activation in the clinical immunology laboratory. *J Immunol Meth* 1993; 157:1-9.



122. Von Krogh M. Colloidal chemistry and immunology. *J Infect Dis* 1916; 19: 452-477.
123. Cozzi E, Bathi F, Schmoeckel M, Chavez G, Smith KG, Zaidi A, Bradley JR, Thiru S, Goddard, Vial C, Ostlie D, Wallwork J, White DJ, Friend PJ. Long-term survival of non human primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation*. 2000; 70:15-21.
124. Richards A C, Davies H F, McLaughlin ML, et-al. Serum anti-pig antibodies as potential indicators of acute humoral xenograft rejection in pig-to-cynomollgus monkey kidney transplantation. *Transplantation*. 2002; 73:881-889.
125. Miyagawa S, Shirakura R, Iwata K, Nakata S, Matsumiya G, Izutani H, Terado A, et-al. Effects of transfected complement regulatory proteins MCP, DAF, and MCP/DAF hybrid on complement-mediated swine endothelial cell lysis. *Transplantation*. 1994; 58: 834-840.
126. Loss M, Vangerow B, SchimidtkoJ, Kunz R, Jalali A, Arends H, Prezemeck M, Ruckholt H, et-al. Acute vascular rejection is associated with systemic complement activation in a pig-to primate kidney xenograft model. *Xenotransplantation* .2000; 7:186-196.
127. Boyun A: Separation of leucocytes from blood and marrow. *Scand J Clin Lab Invest*. 1968; 21( suppl 97):77
128. June CH, Rabinovitch PS. Immunofluorescence and cell sorting. *Current protocols in Immunology*. Coligan JE, Kuisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W green Publishing nad Wiley Interscience NY.1991:5.01
129. Pross HF, Baines MG, Rubin P, Shragge P, Patterson MS. Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX The quantitation of natural killer activity. *J Clin. Immunol*.1981; 1:51-63.
130. Leatherbarrow R J. *Grafit User's Guide* version 4,0. Erithacus Software Ltd, Staines UK 1998: 185-194
131. Bryant J, Day R, Whiteside TL, Heberman RB. Calculation of lytic units for the expression of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Meth*.1992; 146: 91-103
132. Pross HF, Maroun JA. The standardization of NK cell assays for use in studies of biological response modifiers.*J Immunol Meth* 1984; 68:235-249.

133. Callewaert D M, Smeekens S P, Mahle N H. Improved quantification of cellular cytotoxicity reactions: Determination of kinetic parameters for natural cytotoxicity by distribution-free procedure. *J Immunol Meth* 1982; 49:25-37.
134. Tschopp J, Masson D, Schafer S, Peitsch M, Preissener KT. The heparin binding domain of S-protein vitronectin binds to complement C7, C8, and C9 and perforin from cytolytic T-cells and inhibits their lytic activities. *Biochemistry* 1988; 27:4103-4109.
135. Ecker EE, Gross P. Anticomplementary power of heparin. *J infect Dis.* 1929; 44: 250-253.
136. Sahu A, Pangburn M. Identification of multiple sites of interaction between heparin and the complement system. *Mol Immunol* 1993; 30:679-84.
137. Gonzalez-Stawinski G, Daggett C W, Lau CL, Karoor S, Love SD, Logan JS, Gaca JG, Parker W. Non-anti-Gal  $\alpha$  1-3 Gal antibody mechanisms are sufficient to cause hyperacute lung dysfunction in pulmonary xenotransplantation. *J Am Coll Surg.* 2002; 194:765-773.
138. Zhu A. Binding of human natural antibodies to non  $\alpha$ -Gal xenoantigens on porcine erythrocytes. *Transplantation.* 2000; 69:2422-2428.
139. Buhler I, Xu Y, Li W, Zhu A, Cooper DKC. An investigation of the specificity of induced anti-pig antibodies in baboons. *Xenotransplantation.* 2003; 10:88-93.
140. Linderborg E, Kumagai-Braesch M, Tibell A, Moller E. Continued production of xenoimmune antibodies 6-8 years after clinical transplantation of fetal pig islet – like cell clusters. *Xenotransplantation.* 2001; 8:273-283.
141. Cairns T, Lee J, Goldberg LC, Hakim N, Cook T, Rydberg L, Samuelsson B, Taube D. Thomsen-friedenreich and P<sup>K</sup> antigens in pig-to-human xenotransplantation. *Transplant Proc.* 1996; 28:795-796
142. McMorow IM, Buhler L, Treter S, Neethling FA, Alwayn IP, Com CA, Kitamura H, Awwad M, DerSimonian H, Cooper DK, Sachs D, LeGuern C. Modulation of “in vivo” primate anti-Gal response through administration of anti-idiotypic antibodies. *Xenotransplantation* 2002; 9:106-114.



143. Dehoux JP, de la Parra B, Latinne D, Bazin H, Gianello P. Characterization of baboon antiporcine IgG antibodies during acute vascular rejection of porcine kidney xenograft. *Xenotransplantation*. 2002; 9:338-349.
144. Zhu A, Hurst R. Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in health human serum. *Xenotransplantation*. 2002; 9:376-381.
145. Griffith LM, Klein HG. Immunopatology. En Rich RR, Fleisher T, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder J. *Clinical Immunology* Mosby. London UK. 2001:127.1-10
146. Acton RT. The major histocompatibility complex. Rich RR, Fleisher TH, Sheares W, Kotzin B, Schroeder H. eds. *Clinical Immunology. Principles and Practice*. Mosby London .UK 2001. p.6.01-13
147. Platt JL, Lindman BJ, Chen H, Spitalnik SL, Bach FH. Endothelial cell antigens recognized by xenoreactive human natural antibodies. *Transplantation*. 1990; 50:817-822
148. Galili U. Interaction of natural anti-Gal antibody with  $\alpha$ -Galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today*. 1993;14:480
149. Yu PB, Holzkecht ZE, Bruno D, Parker W, Platt JL. Modulation of natural IgM binding and Complement activation by natural IgG antibodies. *J of Immunol*. 1996; 157:5163-5168.
150. Fischel RJ, Bolman RM, Platt JL, Najarian JS, Bach FH, Matas AJ. Removal of IgM anti-endothelial antibodies results in prolonged cardiac xenograft survival. *Transplant Proc*. 1990; 22:1077.
151. McKane W, Lee J, Preston R, et al Polymorphism in the human anti-pig natural antibody repertoire: Implication for antigen-specific immunoadsorption. *Transplantation*. 1998; 66:626.
152. Collins Bh, Parker W, Platt JL. Characterization of porcine endothelial cell detrmionants recognized by human natural antibodies. *Xenotransplantation*. 1994; 1:36-46.
153. Landsteiner K, The specificity of serological reactions. 1962. Dover publications. New York.



154. Hallberg EC, Strokan V, Cairns TD, Breimer ME, Samuelsson BE. Chemical and lectin-gold electron microscopical studies of the expression of the Gal  $\alpha$  1-determinant in the pig aorta. *Xenotransplantation*. 1998; 5:246-256.
155. Hallberg E, Holgersson J, Samuelsson Bo E. Glycosphingolipid expression in pig aorta: identification of possible target antigens for human natural antibodies. *Glycobiology*. 1998; 8:637-649
156. Gerber B, Tinguely C, Bovin NV, Rieben R, Carrel T, Nydegger UE. Differences between synthetic oligosaccharide immunoabsorbents in depletion capacity for xenoreactive anti-Gal  $\alpha$ 1-3Gal antibodies from human serum. *Xenotransplantation*. 2001; 8:106-114.
157. Satapathy A K, Ravindran B Naturally occurring  $\alpha$ -galactosyl antibodies in human sera displays polyreactivity. *Immunology Letters*. 1999; 347-351.
158. Magnusson S, Strokan V, Mansson JE. Nglycolylneuraminic acid terminated ganglioside xenoantigens of pig lymphocytes elicit immune response in human after pig kidney xenoperfusion. Nagoya Japan: 5<sup>th</sup> Congress of the international xenotransplantation Association, 1999.
159. Gollackner B, Gosh S-K, Daniel S.et-al. Porcine endothelial cell tissue factor induction by baboon xenoreactive antibodies "in vitro": evidence for pathogenic role of non Gal antibodies. Chicago, USA 6<sup>th</sup> Congress of the international xenotransplantation Association, 2001.
160. Palmethofer A, Galili U, Dalmsso A, Robson SC, Bach F.  $\alpha$  galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: Type II activation. *Transplantation*. 1998; 65:971-978.
161. Iwata K, Seya T, Ariga H, Nagasawa S. Expression of hybrid complement regulatory protein, membrane cofactor protein decay accelerating factor on CHO cells; comparison of its regulatory effect with those of decay accelerating factor and membrane cofactor protein. *J. Immunol*. 1994; 152:3436.
162. Kennedy SP, Rollins SA, Burton WV, Sims PJ, Bothwell ALM, Squinto SP, Zavoico GB. Protection of porcine aortic endothelial cells from complement-mediated cells lysis and activation by recombinant human CD59. *Transplantation*. 1994; 57:1494.

163. HecklOstreicher B, Wosnik A, Kirschfink M. Protection of porcine endothelial cells from complement mediated cytotoxicity by the human complement regulators CD59, C1 inhibitors and soluble complement receptor type 1: Analysis in a pig to human "in vitro" model relevant to hyperacute xenograft rejection. *Transplantation*. 1996; 62:1693.
164. McCurry KR, Koyman DL, Alvarado CG, Cotterel AH, Martin M, Logan JS, Platt JL. Human regulatory proteins protect swine- to -primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med*. 1995; 1:423-427.
165. Cozzi E, Bathi F, Schmoeckel M, Chavez G, Smith KG, Zaidi A, Bradley JR, Thiru S, Goddard, Vial C, Ostlie D, Wallwork J, White DJ, Friend PJ. Long-term survival of non human primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation*. 2000; 70:15-21.
166. Ramirez P, Chavez R, Majado M, Munitiz V, Muñoz A, Hernandez Q, Palenciano CG, Pinochaloba M. et-al. Life-supporting human complement regulator decay accelerating factor transgenic pig liver xenograft maintains the metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to 8 days. *Transplantation*. 2000; 70:989-998.
167. Miyagawa S, Hirose H, Shirakura R, Naka Y, Nakata S, Kawashima Y. et-al. The mechanism of discordant xenograft rejection. *Transplantation*. 1988; 46:825-830.
168. Dalmaso AP, Vercellotti GM, Platt JL, Bach FH. Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay accelerating factor: potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation*. 1991; 52:530-533.
169. Kroshus TJ, Bolman RM III, Dalmaso AP, Rollins SA, Guilmette I, Williams BL, Squinto SP, Fodor WL. Expression of CD59 in transgenic pig organs enhanced organ survival in an "ex vivo" xenogeneic perfusion model. *Transplantation*. 1996; 61:1513-1521.
170. Kulic DM, Salerno CT, Dalmaso AP, Park SJ, Guzman M, Fodor WL, Bolman III RM. Transgenic swine lungs expressing human CD59 are protected from injury in a pig-to-human model of xenotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000; 119:690-699.



171. Azimzadeh A, Zorn GL, Blair KS, Zhang JP, Pfeiffer S, Harrison RA, Cozzi E, White DJ, Pierson. Hyperacute lung rejection in the pig to-human model 2. Synergy between soluble and membrane complement inhibition. *Xenotransplantation*. 2003; 10:120-131.
172. Kujundzic M, Koren E, Neethling FA, Milotic F, Kosec M, Kujundzic T, Martin M, Cooper DKC. Variability of anti- $\alpha$ Gal antibodies in human serum and their relation to serum cytotoxicity against pig cells. *Xenotransplantation*. 1994; 1:58-65.
173. Neethling F, Cooper DKC. Serum cytotoxicity to pig cells and anti  $\alpha$ Gal antibody level and specificity in human and baboons. *Transplantation*. 1999; 67: 658-665.
174. Lin SS, Weidner BC, Byrne GW, Diamond LE, Lawson JH, Hoopes, Daniels LJ, Dagget CW, Parker W. et-al. The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants. *J Clin Invest*. 1998; 101:1745.
175. Verbackel CA, de Bruin RW, Bonthuis F, Jonker M, Dekker S, Marquet RL, Ijzermans JN. *Xenotransplantation*. 2001; 8:284-91.
176. Carrington CA, dos Santos Cruz G. Effect of cell surface concentration of hDAF on trasgenic aortic endothelial cells on the degree of protection afforded against human complement deposition. *Xenotransplantation*. 2001; 8:100-5.
177. Costa C, Zhao L, Decesare S, Fodor WL.. Comparative analysis of three genetic modification designed to inhibit human serum-mediated cytolysis. *Xenotransplanation*. 1999;6-16.
178. Houle IJ, Hoffman EM. Evidence for restriction of the ability of complement to lyse homologous erythrocytes. *J Immunol*. 1984; 133: 1444-52.
179. Ish C, Ong GL, Desai N, Mattes MJ. The specificity of alternative complement pathway-mediated lysis of erythrocytes a survey of complement and target cells from 25 species. *Scand J Immunol*. 1993;38:113-122
180. Meri S, Pangburn MK. Discrimination between activators and non activators of the alternative pathway of complement: regulation via sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci USA* .1990; 87:3982-3986.



181. Van Der Berg CW, Morgan BP. Complement inhibiting activities of human CD59 and analogues from rat, sheep and pig are not homologously restricted. *J Immunol*.1994; 152:4095-4101.
182. Rushmere NK, Tomlinson S, Morgan BP. Expression of rat CD59: functional analysis confirms lack of species selectivity and reveals that glycosylation is not required for function. *Immunology*.1997; 90:640-646
183. Hanna SM, Williams GT, Vanderberg CW, Morgan BP. Characterization “in vitro” and “in vivo” of the pig analogue of human CD59 using new monoclonal antibodies. *Immunology*. 1998; 95:450-459.
184. Yamamoto H, Blaas P, Nicholsson-Weller A, Hansch GM. Homologous species restriction of complement mediated killing of nucleated cells. *Immunology* 1990; 70:422-426.
185. Shin ML, Hansch G, Hu VW, Nicholson-Weller A. membrane factors responsible for homologous species restriction of complement-mediated lysis: evidence for a factor other than DAF operating at the stage of C8 and C9. *J Immunol* 1986; 136:1777-1782.
186. Quigg RJ, Nicholson-Weller A, Cybulsky AV, Badalamenti J, Salant DJ. Decay accelerating factor regulates complement activation on glomerular epithelial cells. *J Immunol*. 1989; 142:877-882.
187. Zhong RK, Kozii R, Ball ED. Homologous restriction of complement-mediated cell lysis can be markedly enhanced by blocking decay-accelerating factor. *Br J Haematol*.1995;91:269-274.
188. Brooimans RA, Van Wieringen PA, van Es LA, Daha MR, Relative role of decay accelerating factor, membrane cofactor protein, and CD59 in the protection of human endothelial cells against complements mediated lysis. *Eur J Immunol*. 1992; 22:3135-3140.
189. Harris CL, Spiller OB, Morgan BP. Human and rodent decay accelerating factors CD55 are not species restricted in their complement-inhibiting activities. *Immunology* 2000; 100:462-470.

190. Sun XJ, Funk CD, Deng CJ, Sahu A, Lambris JD, Song WC. Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocytes surface as revealed by gene targeting. *Proc Natl acad Sci USA*. 1999; 96:628

